

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD (LYON I)
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1972 - N°

077

**ÉTUDE ANALYTIQUE
DES COMPOSÉS PROTÉIQUES DU PLASMA
DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL D'ÉLEVAGE**
(*Salmo gairdnerii* Richardson)

THÈSE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 21 Décembre 1972
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

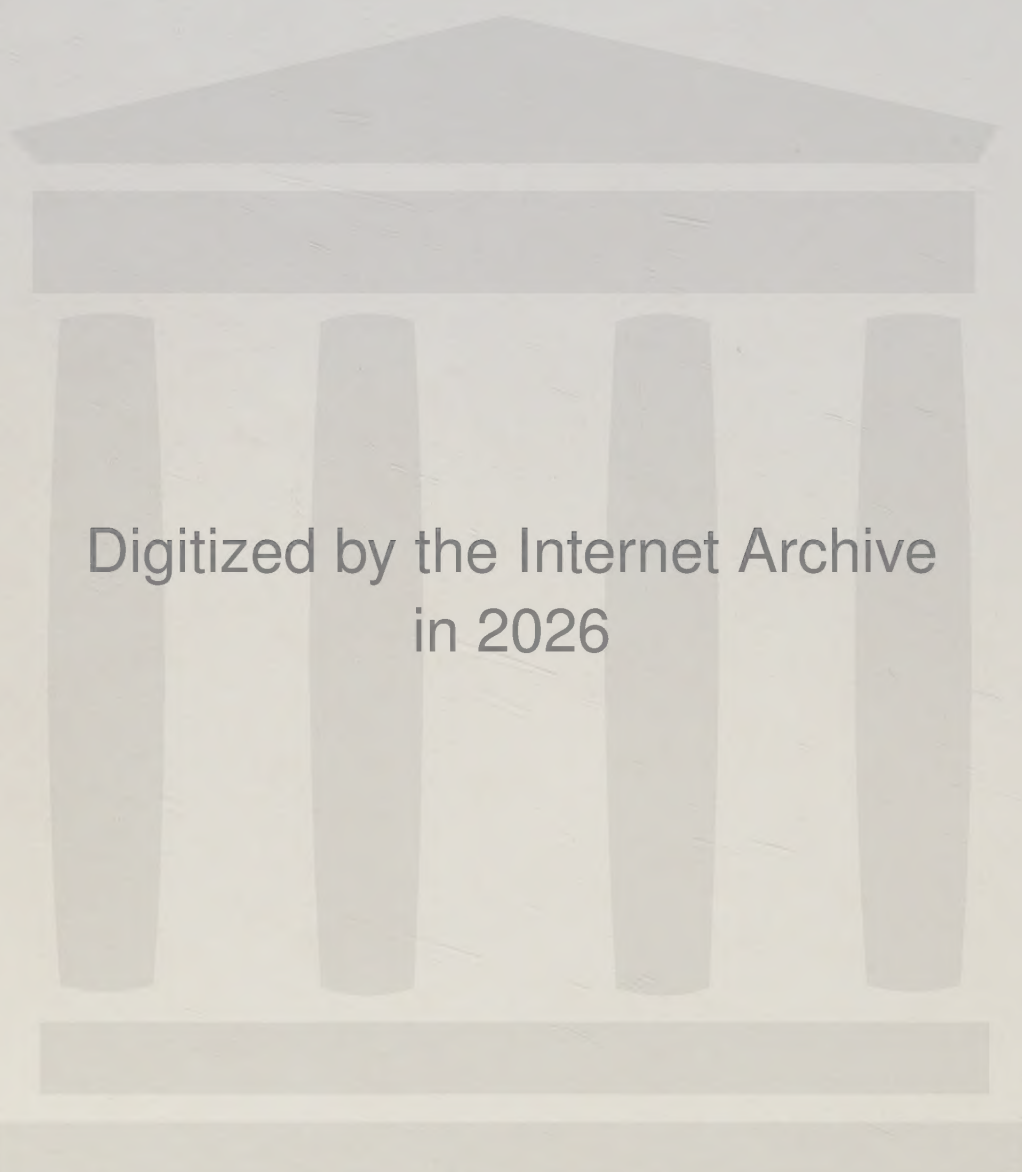
par

Jean-Pierre DELCROIX

Pharmacien Chimiste de 2^e classe

né le 20 Février 1946

à PARIS (Seine)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552617_0059

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD (LYON I)
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1972 - N°

**ÉTUDE ANALYTIQUE
DES COMPOSÉS PROTÉIQUES DU PLASMA
DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL D'ÉLEVAGE**

(Salmo gairdnerii Richardson)

THÈSE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON

Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques

et soutenue publiquement le 21 Décembre 1972
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

par

Jean-Pierre DELCROIX

Pharmacien Chimiste de 2^e classe

né le 20 Février 1946

à PARIS (Seine)

UNIVERSITÉ CLAUDE-BERNARD (LYON I)
UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

Année 1975 - N°

ÉTUDE ANALYTIQUE
DES COMPOSÉS PROTÉIQUES DU PLASMA
DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL D'ÉLEVAGE
(*Salmo gairdnerii* Richardson)



THÈSE

présentée

à l'Université Claude-Bernard - LYON
Unité d'Enseignement et de Recherche
des Sciences Pharmaceutiques
et soutenue publiquement le 21 Décembre 1975
pour obtenir le grade de Docteur en Pharmacie

par

Jean-Pierre DELCROIX
Pharmacien Chimiste de 2^e classe

né le 20 Février 1948

à PARIS (Seine)

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD

LYON

Président : Monsieur le Professeur J. BOIDIN
1er Vice-Président : M. R. TOURAINE, Maître de Conférences-Agrégé
2ème Vice-Président : M. P. PONCET, Maître Assistant
3ème Vice-Président : M. D. SETTELEN, Etudiant.

UNITES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Unités

Directeurs

U.E.R. Médicale Grange-Blanche	M. le Professeur D. GERMAIN
U.E.R. Médicale Alexis Carrel	M. le Professeur C. GIROD
U.E.R. Médicale Lyon-Nord	M. le Professeur A. BERTOYE
U.E.R. Médicale Lyon-Sud-Ouest	M. le Professeur L. TOLOT
U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques	M. M. CARRAZ, Maître de Conférences-Agrégé
U.E.R. des Techniques de Réadaptation	M. le Professeur P. MOUNIER-KUHN
U.E.R. de Biologie Humaine	M. J. C. CZYBA, Maître de Conférences-Agrégé
Institut Régional d'Education Physique et Sportive	M. J. SAPIN, Professeur E.P.S.
U.E.R. de Mathématiques	M. le Doyen J. BRACONNIER
U.E.R. de Physique	M. le Professeur M. DUFAY
U.E.R. de Chimie et Biochimie	Mlle le Professeur D. GAUTHERON
U.E.R. des Sciences de la Nature	M. le Professeur L. DAVID
U.E.R. de Biodynamique et Psychopédagogie	M. le Professeur J. CHANEL
U.E.R. de Physique Nucléaire	M. le Professeur A. SARAZIN
Institut Universitaire de Technologie I	M. le Professeur L. FEUVRAIS
Institut Universitaire de Technologie II	M. J. GALLET
Observatoire	M. le Professeur J. H. BIGAY

Secrétaire Général : M. P. IZAUTE

Examineurs de la Thèse :

Président : Monsieur le Professeur Jean GRAS

Assesseurs : Monsieur le Professeur Daniel VINCENT
Monsieur le Professeur Charles BIZOLLON
Monsieur le Professeur Gabriel PERES
Monsieur Henri PERRIER

A mes Parents,

A ma Femme,

A mes Beaux-Parents

A ma Famille,

A tous ceux qui me sont chers.

A NOTRE PRESIDENT DE THESE,

Monsieur le Professeur Jean GRAS,
Professeur de Biochimie Pharmaceutique

Nous avons été très touché par l'accueil
sympathique qu'il nous a réservé dans son laboratoire.

Malgré notre inexpérience, il a bien voulu
nous confier ce travail qu'il a encouragé par ses conseils et
sa compétence.

Nous nous souviendrons de la qualité de son
enseignement et de sa gentillesse.

Il nous a fait l'honneur de présider notre
jury de thèse.

Qu'il trouve ici le témoignage de notre
attachement et de notre reconnaissance.

A NOS JUGES,

Monsieur le Professeur Daniel VINCENT
Professeur de Biochimie Appliquée.

Nous sommes heureux de le compter parmi nos juges. Sa bienveillance et son expérience nous ont été profitables pour la réalisation de ce travail.

Qu'il nous permette de lui adresser nos remerciements et nos hommages respectueux.

Monsieur le Professeur Charles BIZOLLON,
Professeur de Physique Pharmaceutique.

Il a bien voulu s'intéresser à notre travail et en a aidé la réalisation.

Nous le remercions d'avoir accepté de nous juger et le prions de trouver ici le témoignage de notre reconnaissance.

Monsieur le Professeur Gabriel PERES,
Professeur de Physiologie animale.

Nous avons été heureux de bénéficier de son enseignement à la Faculté des Sciences. Il nous honore en acceptant de juger ce travail.

Nous lui sommes reconnaissant d'apporter la garantie de sa très haute compétence.

Monsieur Henri PERRIER,
Docteur en Médecine
Assistant de Chimie Biologique.

Qu'il connaisse notre admiration pour l'autorité et la compétence avec lesquelles il a conçu et dirigé ce travail. Sa personnalité nous a profondément marqué. Dépasant le cadre de cette thèse, il a su nous donner, par ses conseils et son exemple, une véritable formation de chercheur.

Nous nous souviendrons avec fierté et reconnaissance, des principes qu'il nous a inlassablement enseignés.

A Madame Chantal PERKIER
Maître-Assistant de Biochimie Pharmaceutique

Nous avons pu juger de la conscience avec laquelle elle accomplit ses fonctions dans le laboratoire.

Son aide attentive et toujours discrète, son souci de la perfection nous ont été extrêmement précieux.

Nous lui sommes reconnaissant de nous avoir accordé son amitié.

A Monsieur Gérard GALY,

Nous le remercions de sa collaboration efficace.

A Madame Yvette GUDEFIN,

Nous la remercions pour la gentillesse qu'elle nous a toujours témoignée.

A tous les membres du Laboratoire de Biochimie Pharmaceutique.

A Monsieur CROSET et au Personnel de l'Etablissement de Pisciculture de SAINT-SAVIN.

A NOS CHEFS DU SERVICE DE SANTE DES ARMEES

Monsieur le Médecin Général Inspecteur H. BAYLON
Directeur de l'Ecole d'Application du Service de
Santé des Armées.

Monsieur le Médecin en chef de 1ère classe L. GIRIER
Médecin chef de l'Hôpital d'Instruction des Armées
DESGENETTES.

Monsieur le Pharmacien Chimiste de 1ère classe C. PARADO
Chef du Laboratoire de Chimie de l'Hôpital d'Instruction
des Armées DESGENETTES.

A mes camarades du Service de Santé des Armées.

A NOS MAITRES,

Unité d'Enseignement et de Recherche des Sciences Pharmaceutiques de LYON.

Ecole du Service de Santé des Armées.

Ecole d'Application du Service de Santé des Armées.

INTRODUCTION

Les protéines plasmatiques des Poissons ont fait l'objet de nombreux travaux. Cependant, ces études peuvent paraître de bien faible importance lorsque l'on considère l'étendue de cette branche du Règne Animal. Si les Mammifères comportent 600 espèces environ, elles se comptent par milliers chez les Poissons, et nombreuses sont celles qui ne sont pas encore décrites.

Outre cette multiplicité des espèces, il faut considérer les modes de vie différents de ces animaux qui évoluent dans des conditions biologiques extrêmement variées. L'influence des facteurs écologiques, maintes fois soulignée, empêche de donner une portée générale aux résultats obtenus.

Dans ces conditions, il est plus difficile que chez les Mammifères de donner une vue d'ensemble de la nature et de la répartition des protéines plasmatiques des Poissons, ceci d'autant plus que, dans bien des cas, l'absence de bases biochimiques gêne considérablement l'interprétation des phénomènes physiologiques.

Le travail qui nous a été confié, essaie, dans une certaine mesure de répondre à ces problèmes. Sa réalisation analytique et les conclusions qui en découlent ont été rendues possibles par l'utilisation d'une espèce, la Truite arc-en-ciel d'élevage, immature, *Salmo gairdnerii* Richardson, dont la standardisation peut être considérée comme satisfaisante, du moins pour tous les problèmes généraux ayant trait aux conditions d'élevage.

Cette étude générale concernant les protéines plasmatiques s'intègre dans le cadre des recherches entreprises par le Professeur J. GRAS, depuis plusieurs années sur la Biochimie des Poissons.

Diverses techniques analytiques ont été mises en oeuvre, et en particulier l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, qui par son grand pouvoir de résolution a été utilisée comme technique de base.

Les résultats obtenus nous ont permis de proposer une classification originale des protéines plasmatiques. Deux d'entre elles, le Fibrinogène et la Transferrine, ont été localisées et identifiées avec certitude : ce nombre est, certes, limité, mais nous pensons toutefois que ce travail qui n'est qu'une première approche, constitue cependant une base valable pour des études ultérieures plus détaillées, non seulement, chez la Truite arc-en-ciel d'élevage, mais pour toute autre espèce de Poissons.

PLAN

CHAPITRE I : LES PROTEINES PLASMATIQUES CHEZ LES POISSONS

- I - Techniques d'étude des protéines plasmatiques
- II - La protéinémie et ses variations :
 - 1°) Variations liées à l'animal
 - 2°) Variations liées à l'écologie
- III - Etude analytique des Protéines Plasmatiques :
 - A - Données générales
 - 1°) Les protéines
 - 2°) Les glycoprotéines
 - 3°) Les lipoprotéines
 - B - Etudes particulières
 - 1°) Les transferrines
 - 2°) Les immunoglobulines
 - 3°) Les protéines de liaison des iodures
 - 4°) Les protéines transporteuses d'hormones
 - 5°) Les protéines de la coagulation
 - 6°) Les enzymes plasmatiques

CHAPITRE II : MATERIEL ET TECHNIQUES

- ANIMAUX ET PRELEVEMENTS

- TECHNIQUES

- I - Méthodes de dosage
 - 1°) Dosage des protéines
 - 2°) Dosage des fractions lipidiques des lipoprotéines
- II - Electrophorèse en gel de polyacrylamide : disc electrophoresis
 - 1°) Généralités
 - 2°) Techniques utilisées
 - 3°) Electrophorèse en gradient de concentration d'acrylamide.
- III - Chromatographie sur gel de dextran
 - 1°) Généralités
 - 2°) Technique utilisée.

IV - Précipitations par le sulfate d'ammonium

- 1°) Traitement du plasma total
- 2°) Précipitations fractionnées.

V - Méthode d'étude de quelques caractères physico-chimiques des protéines plasmatiques.

- 1°) Solubilité dans l'acide perchlorique
- 2°) Résistance à la chaleur
- 3°) Influence du mode de conservation

VI - Méthode d'étude des acides aminés du fibrinogène

VII - Recherche d'une céruloplasmine

- A - Recherche d'une activité oxydasique
- B - Dosage du cuivre par absorption atomique

VIII - Méthode de localisation de la transferrine par isotope radio-actif

- 1°) Dosages préliminaires
- 2°) Etude par le fer radio-actif.

CHAPITRE III : RESULTATS ET COMMENTAIRES

I - Dosages globaux

- 1°) Dosage des protéines et des lipides
- 2°) Chromatographie des lipides plasmatiques totaux
- 3°) Dosage des fractions lipidiques plasmatiques

II - Electrophorèse en gel de polyacrylamide

A - Aspect général en gel à 9 %

- 1°) Les protéines
- 2°) Les glycoprotéines
- 3°) Les lipoprotéines
- 4°) Electrophorèse des protéines plasmatiques d'autres espèces de Poissons.

B - Aspect général en gel à 5,5 %

C - Electrophorèse en double gel

D - Electrophorèse en gradient de concentration d'acrylamide

III - Chromatographie sur gel de dextran

- 1°) Variations expérimentales
- 2°) Diagramme d'élution
- 3°) Résultats quantitatifs
- 4°) Electrophorèse des fractions correspondant aux pics I, II et III

IV - Précipitations par le sulfate d'ammonium

- 1°) Traitement d'un plasma total
- 2°) Précipitations fractionnées

V - Caractères physico-chimiques

- 1°) Conservation des plasmas
- 2°) Résistance à la chaleur
- 3°) Solubilité dans l'acide perchlorique

VI - Etude du Fibrinogène

- 1°) Etude électrophorétique
- 2°) Etude de la composition en acides aminés

VII - Etude de la céruloplasmine

- 1°) Recherche d'une activité oxydasique
- 2°) Dosage du Cuivre du plasma et des précipités obtenus par le sulfate d'ammonium.
- 3°) Dosage du Cuivre dans les éluats de chromatographie

VIII - Identification de la Transferrine

- 1°) Dosage du fer
- 2°) Electrophorèse sur le plasma total
- 3°) Précipitations fractionnées

CHAPITRE IV : DISCUSSION ET INTERPRETATION

I - Considérations générales

II - Aspect général du diagramme électrophorétique

III - Caractères physico-chimiques

- 1°) Conservation des plasmas
- 2°) Résistance à la chaleur
- 3°) Fractions perchlorosolubles

IV - Estimation des poids moléculaires.

V - Etude individuelle de diverses fractions protéiques

- 1°) Les glycoprotéines
- 2°) Les lipoprotéines
- 3°) Le fibrinogène
- 4°) La céruloplasmine
- 5°) La transferrine
- 6°) La fraction dite albuminique
- 7°) La bande centrale (fraction 6)

VI - Essai de localisation d'autres fractions protéiques

- 1°) Les immunoglobulines
- 2°) La protéines de liaison des iodures
- 3°) L'haptoglobine

VII - Proposition de classification

- 1°) Données de l'électrophorèse
- 2°) Données de la chromatographie
- 3°) Données de la précipitation fractionnée.

VIII - Résumé

CONCLUSIONS

BIBLIOGRAPHIE

CHAPITRE I

LES PROTEINES PLASMATIQUES

CHEZ LES POISSONS.

Avant d'envisager l'étude des protéines plasmatiques des Poissons, il nous a semblé souhaitable d'exposer succinctement les diverses techniques utilisées pour leur dosage et leur fractionnement.

Nous envisagerons en second lieu les relations existant entre les variations de la protéinémie et les conditions écologiques générales. Il convient cependant de souligner que, si ces conditions jouent un rôle important dans le cas des espèces sauvages évoluant dans leur habitat naturel, elles ont une influence beaucoup plus atténuée pour les animaux d'élevage pour lesquels la standardisation permet le plus souvent de négliger ces causes de variabilité.

Nous aborderons enfin, dans une dernière partie, l'examen de quelques protéines plasmatiques des Poissons pour lesquelles les études ont été suffisamment complètes pour qu'il soit possible, à ce jour, de retirer une idée générale de leur rôle et de leur comportement.

I - TECHNIQUES D'ETUDE DES PROTEINES PLASMATIQUES

Le premier problème qui se pose à l'expérimentateur est celui de la standardisation du traitement et de la conservation des animaux. La sensibilité des Poissons au milieu extérieur sera plus longuement développée dans la deuxième partie de cet exposé, mais il faut déjà noter que cette propriété est responsable de la difficulté d'interprétation des résultats.

La nécessité de fixer les conditions expérimentales est illustrée par les travaux de THURSTON (120). Ceux-ci ont signalé des variations au niveau des diagrammes électrophorétiques des protéines plasmatiques de la Truite arc-en-ciel d'élevage, *Salmo gairdneri* Richardson. Ces variations sont attribuées aux méthodes d'échantillonnage, et aux méthodes de capture de l'animal. Les variations interviennent aussi selon la localisation de la prise de sang, aorte dorsale ou ponction intra-cardiaque, et selon la fréquence avec laquelle elle est répétée chez le même animal.

Le taux des protéines plasmatiques varie avec l'âge et le degré de maturité du poisson : il faut donc être sûr de l'homogénéité des lots soumis à l'expérimentation.

Deux autres facteurs importants sont : d'une part, la fixation de la température de l'eau utilisée pour le stockage des animaux, d'autre part la fixation d'un régime alimentaire constant. Ce dernier problème est pratiquement résolu par l'utilisation, pour les animaux d'élevage, d'aliments synthétiques dont les constituants sont rigoureusement dosés.

En fait, chaque espèce est un problème particulier et l'essentiel est de déterminer des conditions standards permettant une reproductibilité satisfaisante des résultats. Il convient donc d'examiner soigneusement le protocole opératoire avant de conclure ou de comparer les résultats obtenus.

Les techniques analytiques utilisées pour l'étude des protéines plasmatiques des Poissons sont les mêmes que celles employées pour le dosage et la séparation des protéines du plasma humain.

L'évaluation de la protéinémie est faite par la réaction du biuret, par réfractométrie, par dosage de l'azote protéique ou par estimation de l'indice de tyrosine par spectrophotométrie du sérum ou du plasma à 280 nanomètres. La séparation des protéines plasmatiques est effectuée par les techniques de précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium et le sulfate de sodium, de chromatographie sur gel de dextran ou enfin par l'adaptation au plasma des Poissons des techniques électrophorétiques et immunoélectrophorétiques.

1°) Précipitations fractionnées.

En 1925, SORENSEN a séparé dans le plasma humain les protéines insolubles à basse force ionique et à pH = 5,5 - 6,8, les euglobulines, de celles solubles dans les mêmes conditions, les pseudoglobulines.

Le même fractionnement a été utilisé chez les Poissons et chez la Truite en particulier (109). Il permet de montrer que les groupes protéiques ainsi séparés ne coïncident pas, par leur solubilité saline, avec les fractions sériques des animaux plus évolués : albumine, alpha, bêta et gamma-globulines. Cette différence fondamentale se retrouve dans l'étude électrophorétique des protéines sériques des Poissons.

2°) Chromatographie sur colonne

Les diagrammes d'élution des protéines plasmatiques obtenus par filtration sur gels de dextran sont également particuliers. Cette technique est surtout utilisée pour la séparation des immunoglobulines comme nous le verrons dans les études du troisième paragraphe concernant l'aspect général des protéines chez les Poissons (86).

3°) Etudes électrophorétiques et immunoélectrophorétiques

L'évolution des techniques électrophorétiques a montré l'extrême complexité du profil protéique du plasma des Poissons.

De nombreuses difficultés surgissent notamment dans la standardisation des techniques, quant à la nature du tampon, au pH utilisé et les contradictions entre les expérimentateurs sont fréquentes. De plus, les travaux de DRILHON (34) ont montré que l'interprétation des diagrammes de sérums ou de plasmas d'animaux inférieurs est parfois difficile à réaliser pour deux raisons :

les fractions protéiques peuvent présenter une faible mobilité et, d'autre part, les diagrammes montrent contrairement aux plasmas humains des teneurs prépondérantes en fractions globuliniques qui se séparent mal en sous-unités. L'auteur en tient pour responsable l'abondance des lipoprotéines plasmatiques nécessitant même une délipidation préalable du plasma de certaines espèces comme l'Anguille, *Anguilla anguilla*, en vue de l'électrophorèse sur papier.

Les techniques d'électrophorèse sur support permettent de séparer de 3 à 8 fractions selon les espèces. Il en est de même pour l'électrophorèse en veine liquide. Des travaux ont été effectués systématiquement sur de nombreuses espèces ainsi chez la Tanche, *Tinca tinca* (6), chez des espèces *Tilapia* (4), chez la Carpe, *Cyprinus carpio* (118) et chez les Téléostéens en général (114)

L'électrophorèse verticale en gel de polyacrylamide, disc-electrophoresis- présente de grandes possibilités de résolution. Elle a permis aux expérimentateurs d'obtenir des profils électrophorétiques complexes dans lesquels la plupart des bandes sont de nature inconnue. Les comparaisons avec le sérum humain ont permis divers rapprochements. Le terme de "fraction like" est employé par certains auteurs. Ceci n'est pas toujours le cas : DEUTSCH et Mac SHAN (30) ne trouvent pas, dans le sérum de Truite arc-en-ciel de fractions comparables aux gamma-globulines des sérums de Mammifères. D'ailleurs BOUCK et BALL (14) se sont aperçus que ces fractions sont peu abondantes chez l'animal vivant dans des eaux propres et qu'elles n'apparaissent qu'avec la pollution.

Les études immunoélectrophorétiques sont elles aussi réalisées systématiquement. Nous citerons par exemple les travaux concernant le Saumon *Salmo salar* (36) et la Truite arc-en-ciel (57). Les immuns sérums sont préparés par injection, le plus souvent à des lapins, de sérums des espèces étudiées. Les travaux effectués dans le laboratoire (113) ont montré, chez la Truite arc-en-ciel, la présence de 8 à 9 arcs de précipitations pour les protéines mais un seul pour les lipoprotéines. L'obtention de ce petit nombre d'arcs serait dû, selon les auteurs, à une carence dans la production d'anticorps spécifiques lors de la préparation de l'immun-sérum chez le lapin. Certains auteurs expliquent cette préparation incomplète par l'éloignement zoologique des deux espèces considérées.

Outre leur caractère analytique, l'établissement des profils électrophorétiques et l'analyse immuno-électrophorétique des sérums de Poissons présentent trois intérêts :

- Le premier est d'étudier, d'une manière détaillée, les retentissements sur les protéines plasmatiques des variations du milieu extérieur. Il est possible ainsi, comme le montrent les expériences de THURSTON (120) déjà citées, d'établir pour chaque poisson en fonction de ces variations une carte protéique précise.
- Le deuxième intérêt découle du précédent : ils permettent l'établissement d'un typage des populations. C'est ainsi que MAIRS et SINDERMAN (86) ont trouvé des différences géographiques dans les diagrammes du Hareng, *Clupea harengus*. De la même manière, Mac KENZIE et PAIM (84) déterminent 8 phénotypes distincts chez le Saumon Atlantique, *Salmo salar*, remontant les rivières nord-américaines.
- Le dernier apport de ces techniques est constitué de données phylogénétiques concernant par exemple l'évolution des Poissons

cartilagineux aux Poissons osseux, montrant une augmentation de la complexité protéique dans ce sens (81).

II - LA PROTEINEMIE ET SES VARIATIONS

L'intervalle des valeurs que peut prendre la protéinémie des Poissons est très étendu. Selon plusieurs auteurs (117), elle varie chez les espèces dulcicoles de 1,97 à 4,65 %. Ces chiffres montrent qu'il n'existe aucune homogénéité des valeurs chez les Poissons d'une même classe, comme il en est d'ailleurs au sein d'une même espèce. Il est impossible de dégager une idée générale concernant la valeur de la protéinémie. Certains auteurs ont montré cependant, ceci sur un plan strictement phylogénétique, qu'il existait au cours de l'évolution, une augmentation quantitative des protéines plasmatiques (59).

1°) Variations liées à l'animal

Ces variations sont dues en premier lieu au dimorphisme sexuel. Il semble que la protéinémie soit en général moins élevée chez la femelle. En fait, ces différences de concentration selon le sexe ont été signalées pour la plupart des composants organiques du plasma, tels que le cholestérol, les acides gras libres et les lipides en général (105).

Chez certaines espèces, le dimorphisme se traduit par l'apparition d'une nouvelle fraction protéique à l'électrophorèse. Ainsi, DRILHON (35) montre chez la Lamproie femelle, *Lampetra fluviatilis*, l'existence d'un constituant supplémentaire à l'immunoélectrophorèse. Il s'agit d'une fraction lipoprotéique de mobilité bêta. L'existence d'une fraction protéique supplémentaire chez la femelle mature est retrouvée chez d'autres espèces comme le Saumon, *Salmo salar* (36) et la Truite d'élevage, *Salmo gairdneri* (113, 120).

Les variations de la protéinémie avec l'âge de l'animal se traduisent chez la Truite arc-en-ciel par une augmentation des protéines plasmatiques jusqu'au 30ème mois (71, 72), le plasma du jeune animal n'ayant qu'un taux faible en protéines. Chez cette même espèce, il semblerait y avoir une diminution de la fraction albuminique aux dépens de la fraction globulinique (103).

L'influence du cycle des saisons sur la protéinémie s'explique d'une part, par la fraie, d'autre part, par la période de jeûne que les animaux subissent chaque hiver. Cette période de jeûne

montre pourquoi les variations se retrouvent aussi chez les animaux immatures. Il faut noter que pendant la fraie, la femelle a une protéinémie plus élevée que celle du mâle. Dans ce cas, les augmentations seraient dues à un accroissement du métabolisme durant la maturation des gonades (11).

Les variations saisonnières affectent aussi les diverses fractions protéiques comme tendent à le prouver des travaux effectués sur la Brème (69) et la Tanche (39). Cependant les modifications sont faibles et ne peuvent être affirmées catégoriquement.

Il est évident que ces variations saisonnières, sont largement dues, outre la fraie, aux changements de l'environnement au cours de l'année.

2°) Variations liées à l'écologie

L'environnement agit sur le poisson d'une part par la température, la luminosité et l'oxygénation déterminant en principe la profondeur de l'habitat. D'autre part, comme nous l'avons entrevu, l'abondance et la qualité de la nourriture entraînent des modifications notables de la protéinémie. La composition ionique de l'eau crée des modifications des profils protéiques chez les espèces euryhalines.

Influence de la température

Ce facteur a fait l'objet de nombreuses études (28, 51, 96, 111).

La température de l'eau influe favorablement sur le taux de croissance de l'animal : ce fait a été remarqué chez l'embryon et chez l'adulte.

De nombreuses espèces, la Perche, *Perca fluviatilis* (76), le genre *gadus* (92) montrent ainsi une plus grande augmentation de poids et de taille si la température du milieu est inhabituellement élevée. Cependant cette élévation de température provoque une augmentation des métabolismes qui expliquerait la réduction de la durée de vie des espèces ainsi acclimatées par rapport à celles vivant dans les eaux froides. Malgré l'augmentation de ce métabolisme, il ne semble pas qu'il y ait de variations de la protéinémie. Chez la Carpe, *Cyprinus carpio*, acclimatée trois semaines à 4°, 17°, 27° et 33°, le taux des protéines plasmatiques croît légèrement de 1,8 à 2,3 g % jusqu'à 27° pour diminuer ensuite (63). Aucune variation n'est enregistrée chez la Truite arc-en-ciel entre 8° et 31°, bien que le rapport albumine/globuline augmente quand la température diminue (91). En fait, l'élévation de température en augmentant les métabolismes accroît les besoins en Oxygène et l'on peut penser qu'il existe alors un remaniement de la pression osmotique du plasma.

Si la protéinémie ne joue aucun rôle dans cette régulation osmotique à des températures moyennes, il semble d'après des travaux récents de UMMINGER (123) qu'il n'en soit pas de même lorsque l'on s'approche du point de congélation du plasma. Ce phénomène se traduit alors par une augmentation de la protéinémie.

Influence de la luminosité et de la profondeur de l'habitat :

Ces deux facteurs, étudiés surtout à des fins de pisciculture, ne semblent pas avoir d'influence sur la protéinémie comme le montrent entre autres les travaux de MEISNER et HICKMAN (91) chez la Truite arc-en-ciel d'élevage.

Influence de l'oxygénation

La protéinémie totale diminue chez le poisson soumis à l'asphyxie comme l'ont montré BARNOUD et PERES (7) chez la Tanche, *Tinca tinca*, et HALL (60) chez *Brevoortia tyrannus*.

Parallèlement à cette instauration d'une hypoprotéinémie, il se produit une augmentation de l'azote non protéique du plasma.

Un deuxième type d'expériences consiste, non plus à observer les effets d'un stress chez l'animal, mais une modification des diverses fractions protéiques dans des conditions précises d'oxygénation.

Les études électrophorétiques de THURSTON (120) ne montrent chez la Truite arc-en-ciel adaptée à des concentrations de plus en plus basses en oxygène dissout, aucune modification du diagramme protéique. Ceci ne semble pas être une règle générale chez les Poissons : BOUCK et BALL (13) observent des variations électrophorétiques chez deux espèces : *Lepomis macrochirus* et *Micropterus salmoides*.

Influence de l'alimentation :

Il faut envisager, d'une part l'alimentation du poisson dans les élevages et d'autre part celle dans son milieu naturel, là où sont respectées les conditions d'environnement.

Les nombreux travaux de PHILLIPS et coll. (106, 107, 108) montrent le rôle important de la composition de la nourriture dans la croissance du poisson.

Les travaux de JURCA (67) chez la Truite arc-en-ciel d'élevage établissent la comparaison entre deux régimes, l'un composé de nourriture fraîche, l'autre de nourriture sèche. Ces derniers sont des régimes de substitution, équilibrés en matières protéiques et minérales, en hydrates de carbone, en matières grasses ainsi qu'en vitamines et pour la plupart additionnés d'antibiotiques à dose minime (600 mg/100 kg).

Le second mode d'alimentation crée une protéinémie de 4,8 g % alors qu'elle n'est que de 3,5 g % pour les animaux nourris de viande et de farine. Il faut noter de plus la possibilité d'accroître encore la protéinémie par addition à la nourriture de molybdate d'ammonium. Ceci entraîne une augmentation nette des fractions albuminique et alpha-globulinique par rapport aux bêta globulines.

Il a été noté des variations du régime des Poissons, dans leur milieu naturel, selon le sexe et l'habitat. Ce phénomène a été observé par NIKOLSKY chez la Brème, *Abramis brama*, de la mer d'Azov (97).

Influence du jeûne :

La protéinémie pour les animaux en habitat naturel ou en élevage varie peu et très lentement malgré les restrictions alimentaires. Chez la Carpe, *Cyprinus carpio*, soumise à un jeûne de six mois, SORVACHEV (116) montre une diminution de la protéinémie qui passe de 3,9 à 2,8 g %, avec des modifications électrophorétiques des diverses fractions protéiques et notamment de la fraction albuminique.

Cette diminution est très faible compte-tenu de la longue durée du jeûne. Des variations plus importantes de la fraction albuminique ont été mises en évidence chez la Truite, *Salmo trutta* (17), chez la Roussette, *Scyllium canicula* (23).

Parallèlement à cette diminution de la protéinémie, il faut noter l'élévation du taux de quelques acides aminés libres comme la valine, la leucine et l'isoleucine (25).

Influence de la salinité de l'eau :

Les variations de la protéinémie sous l'influence de la salinité sont la conséquence des modifications du volume sanguin.

Dès 1904, GREENE (37) notait par cryoscopie une élévation du point de congélation du plasma lors du passage d'un poisson marin dans l'eau douce. De nombreux travaux ultérieurs sont consacrés à l'étude des possibilités de survie des poissons transférés dans des milieux étrangers aux leurs : étude de l'agression osmotique sur la protéinémie de la Ras-casse (21), de l'Anguille de mer *Anguilla anguilla* (22), du Congre, *Con-ger vulgaris* (12).

En fait, dans le cas des Salmonidés tout au moins, les réponses à un choc osmotique peuvent être divisées en deux phases successives : une phase brutale d'adaptation suivant immédiatement le transfert du poisson de l'eau douce dans l'eau de mer. Elle consiste en une perte rapide d'eau amenant une augmentation de la concentration de tous les composés et ions du sang notamment des protéines. Cette période est suivie d'une

phase de régulation lente ayant pour résultat l'établissement d'un nouvel équilibre osmotique respectant l'eau tissulaire et la composition en électrolytes des tissus.

Les modifications des protéines plasmatiques ne sont peut-être pas seulement quantitatives. En effet, l'utilisation de l'électrophorèse a permis à LECAL (75) de remarquer une modification totale, en un jour, du profil protéique de *Blennius pavo* lorsqu'on transfère celui-ci de son habitat marin naturel dans l'eau douce.

Ces conclusions ne s'appliquent qu'à des expériences effectuées en laboratoire. Dans la réalité, les changements d'un milieu salin à un milieu dulcicole sont progressifs et ne concernent que les espèces euryhalines.

Les variations de la protéinémie sont beaucoup plus progressives mais semblent moins spécifiques du changement de milieu. En effet, l'Alose, *Alosa harengus*, par exemple, a une protéinémie plus basse en eau douce qu'en eau salée, mais il s'agit d'une espèce anadrome c'est-à-dire remontant les cours d'eau pour frayer. Ceci fait qu'il est impossible d'attribuer distinctement la baisse de la protéinémie à la reproduction ou aux phénomènes osmotiques créés par la migration dans deux milieux différents (115).

Des études identiques ont été réalisées chez les espèces catadromes principalement chez les Anguilliformes. Elles portent, pour la plupart, sur l'action des hormones hypophysaires (16) des corpuscules de Stannius et des composés adrénocorticaux sur la régulation de la pression osmotique (19).

De nombreux autres paramètres sont susceptibles de modifier la Biologie des Poissons et notamment la présence dans l'eau de certains ions métalliques. Ces composés peuvent s'y trouver à des fins piscicoles comme nous l'avons vu pour le molybdate d'ammonium ; il en est de même pour le chlorure de Cobalt qui ajouté à l'alimentation provoque un remaniement de la répartition des graisses chez la Truite arc-en-ciel, *Salmo gairdnerii* et augmente ainsi la résistance des animaux à l'élévation de température.

Par contre, d'autres molécules peuvent se trouver accidentellement dans l'eau (85), c'est le problème de la pollution aquatique à laquelle sont consacrées de nombreuses études.

III - ETUDE ANALYTIQUE DES PROTEINES PLASMATIQUES

Nous envisagerons d'abord le premier aspect du problème qui vise à individualiser, au sein des protéines plasmatiques des Poissons, des groupes ayant des caractères chimiques ou physico-chimiques communs. En second lieu, nous verrons successivement les composés dont le rôle physiologique est défini et qui ont fait l'objet d'études particulières.

A - DONNEES GENERALES

1°) Les protéines :

Les premières études électrophorétiques des plasmas de Poissons, réalisées sur papier ou en veine liquide ont permis pour la plupart des espèces étudiées, de séparer cinq fractions protéiques. Par analogie aux protéines du plasma humain, les auteurs ont adopté pour les plasmas de Poisson la classification : albumine, alpha 1 et 2, bêta et gamma-globulines, selon les mobilités électrophorétiques. C'est pour cette raison que certains travaux mentionnent l'étude d'un rapport albumine/globulines chez les Poissons en notant d'ailleurs que contrairement aux plasmas humains, il est toujours inférieur à 1, à quelques rares exceptions près (34).

Cette comparaison entre protéines plasmatiques d'espèces zoologiques éloignées semble être assez arbitraire, d'autant plus que les travaux de POST déjà cités démontrent chez la Truite de grandes différences sur le plan des solubilités salines (109). De même, les mobilités électrophorétiques des fractions appelées chez les Poissons, albumine et globulines sont assez peu comparables aux fractions homonymes du plasma humain. Néanmoins, pour la clarté du texte, nous continuerons d'utiliser ces appellations.

2°) Les glycoprotéines :

Les glycoprotéines des sérums de Poissons n'ont été l'objet que de quelques recherches alors qu'elles représentent une part importante des protéines de ces sérums généralement dépourvus d'albumine.

L'étude électrophorétique des sérums de Congre et de Roussette montre une grande richesse en glycoprotéines réparties approximativement dans toutes les fractions (53). La caractéristique de ces glycoprotéines est leur forte teneur en acides sialiques, en général le double de celle rencontrée chez l'Homme.

Des travaux plus récents chez une espèce antarctique du genre *Trematomus* ont permis l'isolement d'une molécule glycoprotéique particulière. Cette glycoprotéine aurait pour propriété d'abaisser le point cryoscopique du plasma d'où son nom "freezing point depressing glycoprotein" (31, 32, 70). Des mesures de cryoscopie réalisées avec des solutions purifiées de ces molécules donnent les mêmes résultats qu'avec les sérums entiers. L'analyse structurale de cette glycoprotéine ne met pas en évidence de caractères particuliers. La présence de cette molécule dans le sérum de ces poissons crée un nouveau genre d'adaptation au froid.

3°) Les lipoprotéines :

Si les glycoprotéines sont peu étudiées en tant que telles, les lipoprotéines le sont encore moins. Cependant les lipides et le métabolisme lipidique chez les Poissons ont été l'objet de nombreuses publications. Ces composés sont présents dans le plasma en grande quantité surtout chez les espèces migratrices. Ces espèces accumulent d'importantes réserves de lipides au cours de leur phase trophique, réserves qu'ils utilisent pour couvrir leurs dépenses énergétiques et pour élaborer les éléments reproducteurs pendant le jeûne synchronique.

Les réserves sont si importantes que chez le Saumon du Pacifique par exemple, les lipides circulants ont des taux vingt fois supérieurs à ceux du sérum humain (48). Les combinaisons des lipides avec les protéines sont encore peu étudiées.

Il semble qu'il s'agisse de cénapses lipoprotéiniques, c'est-à-dire de combinaisons plus ou moins lâches. Les travaux de LAUTER et coll. (74) chez *Squalius acanthias* montrent que le transport des lipides est fait principalement par les chylomicrons et les lipoprotéines de basse densité. La teneur en acides gras libres des lipoprotéines est considérablement plus élevée que dans les fractions comparables chez les Mammifères.

Une fraction de nature lipoprotéique a été plus spécialement étudiée chez la Lamproie, *Lamprolaima fluviatilis* (35). Il s'agit d'un antigène lipoprotéique de mobilité bêta-globulinique. Cet antigène appelé Lf est spécifique du sérum de Lamproie femelle comme cela a été prouvé par immunoélectrophorèse.

B - ETUDES PARTICULIERES

1°) Les transferrines :

Le plasma des Poissons contient une globuline capable de fixer et de transporter des atomes de Fer.

FINE et coll. (46) ont montré que la mobilité électrophorétique des transferrines varie à l'intérieur d'une espèce ce qui offre la possibilité d'étudier les différentes formes de cette molécule. Il semble, d'après FINE et coll. (46), HERSHBERGER (61) entre autres, qu'il s'agisse d'une protéine de grande mobilité électrophorétique. Elle migrerait avec les fractions alpha-2 ou bêta-1 globuliniques.

Les travaux concernant le polymorphisme des transferrines d'une espèce permettent l'étude génétique de celle-ci. De nombreux phénotypes sont mis en évidence pour chaque espèce : ils seraient au nombre de 7 chez l'Anguille, *Anguilla anguilla* (41), et de 3 chez la Carpe, *Cyprinus carpio* (5). Chez cette dernière, il existerait de plus une relation entre certains caractères morphologiques, notamment le poids et la longueur, et la présence des divers types de transferrines. Les expérimentations utilisent la séparation sur résine échangeuse d'ions et les techniques de radio-activité. Il est impossible d'établir une règle générale concernant la structure des transferrines de Poissons, les études réalisées ne portant que sur un nombre très réduit d'espèces. Néanmoins une analyse détaillée a été effectuée pour la transferrine de la grande Roussette, *Scyllium stellare* (54).

La molécule est isolée par précipitation fractionnée et chromatographie sur DEAE-cellulose. La purification est faite par électrophorèse préparative.

L'étude de la structure montre, en particulier, que la molécule est composée de deux chaînes polypeptidiques. Il s'agit d'une glycoprotéine originale puisqu'à caractère basique ; son point iso-électrique est de 9,2, celui de la transferrine humaine étant de 4,2. Les similitudes avec la transferrine humaine portent sur le pourcentage en oses neutres et aminés, sur la teneur en Fer, deux atomes par molécule, et sur leur constante d'association. De plus, les poids moléculaires sont très voisins, entre 75.000 et 80.000. L'écart entre les deux points iso-électriques est probablement dû à l'absence totale dans la transferrine de Roussette d'acides sialiques. Le rôle biologique de ces acides dans les glycoprotéines étant encore mal connu, il est difficile de dire si leur présence dans la transferrine humaine est un signe d'évolution.

2°) Les immunoglobulines :

Les animaux poïkilothermes sont capables d'une réponse immunologique. Cette réponse doit se traduire dans le plasma par une modification des fractions globuliniques. De plus, la majorité des Poissons évolués, c'est-à-dire, ceux appartenant à la Classe des Téléostéens montre une mémoire immunologique.

Nous empruntons à DRILHON (35), les grandes lignes du paragraphe suivant, résumant les connaissances actuelles sur les immunoglobulines des Poissons.

Des travaux déjà anciens ont permis de constater l'absence presque générale de la fraction gamma-2 globulinique chez les Téléostéens. On peut noter, au hasard de la littérature, quelques exceptions peu nombreuses en regard du nombre d'espèces étudiées. Ce sont, par exemple, celles de *Thynnus thynnus*, le Thon rouge, de *Sarda sarda*, de *Salmo lacustris*, de *Salmo gairdnerii*. Ces espèces ont en effet une fraction de mobilité électrophorétique gamma-2 généralement peu importante.

En 1958, BECKER (8) n'avait pas trouvé chez un grand nombre de Téléostéens du Golfe du Mexique et de Floride, de cellules morphologiquement ressemblantes à celles qui président à la synthèse des gamma-globulines chez les Mammifères ; ceci, ni dans la rate, ni dans les reins considérés chez les Poissons comme organe hématopoïétique. ENGLE et coll. (40, 41) ont fait la même remarque.

Les Sélaciens possèdent tous à l'examen électrophorétique sur papier ou en gel d'amidon des fractions gamma-2, migrant plus ou moins loin du point de dépôt et paraissant analogues aux gamma-globulines humaines. Par contre, chez un grand nombre de Téléostéens étudiés, les auteurs constataient l'absence générale de ces mêmes fractions.

Une étude histologique de la rate de ces animaux paraît fournir une explication à cette absence. En effet, la densité des plasmocytes trouvés dans les coupes de rate correspond à la présence des fractions gamma-globuliniques.

On dénombre, au contraire, de très rares plasmocytes dans les rates de Téléostéens non pourvus de ces globulines.

Ces plasmocytes peuvent exister dans la rate et non dans le sang circulant. Ils ont été trouvés par ENGLE et coll. (40, 41) dans les tissus lymphoïdes de *Polyodon spathula* et dans la rate de *Protopterus ethiopicus*. Ces deux espèces ont des fractions gamma-2 à l'électrophorèse sur papier et en gel d'amidon.

Chez les Elasmobranches, des anticorps spécifiques ont été mis en évidence dans les cellules lymphoïdes par la méthode des anticorps fluorescents. Les travaux de MARCHALONIS et EDELMAN (87, 88) sur la Carpe *Cyprinus carpio*, sur *Carassus auratus*, et sur *Mustelus canis* mettent en évidence des ressemblances entre les anticorps des Poissons et les macroglobulines humaines sur le plan des dimensions et de la structure de la chaîne polypeptidique. En effet, après réduction et alkylation, les molécules se résolvent en chaînes polypeptidiques lourdes et légères. Ces poissons ont des immunoglobulines dont les chaînes légères ressem-

blent à celles des Vertébrés par le poids moléculaire et les mobilités électrophorétiques en gel de polyacrylamide. Il en est de même pour les chaînes lourdes.

Chez la Truite arc-en-ciel d'élevage, *Salmo gairdneri*, les travaux de POST (109) montrent que les protéines plasmatiques peuvent être classées en euglobulines et en pseudoglobulines. Cette distinction est effectuée par précipitation sélective par le sulfate de Sodium à 20 %. L'injection à l'animal d'un antigène, ici *Aeromonas hydrophila* provoque l'apparition dans le plasma du poisson, d'anticorps spécifiques agglutinants de la bactérie.

Les constantes de précipitations obtenues et les diagrammes électrophorétiques permettent d'affirmer que ce groupe de protéines formées est différent des gamma-globulines. Elles sont de dimensions moins grandes que les gamma-globulines des animaux plus évolués et notamment que les anticorps formés chez l'Homme. Cependant tous les anticorps formés sont des euglobulines, précipitant en totalité pour une concentration de 20 % en sulfate de Sodium.

Des expériences identiques (62) faites chez le même animal permettent de mettre en évidence des anticorps précipitants dès le 22ème jour de l'immunisation, des agglutinines, des anticorps d'hémagglutination passive présents dans le sérum dès le 31ème jour. Les hémagglutinines isoimmunes se trouvent dans les fractions sériques contenant des composants de constante de sédimentation 10,5 et 13,5 S. Elles migrent à l'électrophorèse comme les bêta-globulines. Aucune fraction de mobilité protéique chez la Truite ne correspond aux mobilités des fractions 19 S et 17 S des Mammifères.

D'autre part, il existe dans le sérum de Truite des hémagglutinines naturelles, spécifiques contre les hématies de lapin, de souris et d'homme. Ces anticorps sont distincts des hémagglutinines isoimmunes.

3°) Les protéines de liaison des iodures :

Les protéines plasmatiques de liaison des iodures ont été mises en évidence chez le Saumon, *Salmo salar* (77). Elles ont été retrouvées chez d'autres Téléostéens mais jamais chez les Cyclostomes, les Elasmobranches et les Chondrostéens.

Cette protéine de liaison est en concentration plus faible chez les Poissons d'eau douce que chez les Poissons marins. Son taux est très élevé chez les espèces euryhalines surtout pendant la période de migration ; il existe une relation évidente avec la taxonomie. Le sang des espèces de grande activité en contient plus que celui des espèces indolentes.

Les travaux de LELOUP (78) énumèrent les caractéristiques de la liaison des iodures dans le plasma des Téléostéens :

- l'iode est fixé sous forme d'iodure.
- la liaison est de nature protéique et se fait avec des molécules migrant à l'électrophorèse dans la zone des albumines. La liaison de ferait ainsi avec des molécules d'un poids moléculaire d'environ 70.000.
- la constante d'association est bien déterminée.

Le rôle de ces protéines fixatrices d'iodure serait de limiter la perte d'iode au niveau branchial et rénal. Ceci expliquerait pourquoi les Téléostéens étant pratiquement les seuls à posséder de telles molécules appelées iodurophorines par LELOUP, ont les iodurémies les plus élevées.

Il existerait des variations sexuelles et saisonnières. Le plasma des Poissons mâles semble avoir une plus grande capacité de fixation que celui des femelles, ce qui s'expliquerait par le fait que la fraction dite albuminique est plus importante quantitativement chez le mâle. Les variations au cours de l'année sont faibles et ne peuvent en aucun cas être attribuées soit à la maturation des gonades, soit aux changements de température (64).

Les études structurales sont inexistantes. Les travaux de HUANG et coll. cités précédemment (64) montrent que les sites fixateurs d'iodure sont vraisemblablement les groupements cationiques des acides aminés basiques des protéines. De ces mêmes travaux, il ressort que le transport des iodures peut être inhibé par les nitrates, les thiocyanates, les perchlorates et les trichloracétates.

4°) Les protéines transporteuses d'hormones et les hormones protéiques :

Les hormones sont des composés plasmatiques très étudiés chez les Poissons et leur présence a été démontrée par leurs effets physiologiques. Nous aborderons seulement ce sujet par des exemples, bien que quelques formes de transport aient été signalées.

Les hormones thyroïdiennes, thyroxine et triiodothyronine, existent chez les Poissons (89). La régulation de leur synthèse est comparable à celle existant chez les Mammifères ; elle est sous la dépendance des hormones pituitaires (T.S.H.). Leur transport est effectué dans le plasma par des molécules de mobilité électrophorétique voisine de celle des fractions albuminique-like. Ce fait a été démontré par l'utilisation d'isotopes radio-actifs ^{125}I , notamment chez le Saumon de fontaine, *Salvelinus fontinalis* (42).

D'autres protéines étudiées sont celles présentant des affinités pour les hormones sexuelles et les corticostéroïdes, ceci chez trois espèces : le Saumon, *Salmo salar*, la Morue, *Gadus morhua* et une Raie *Raja radiata* (49). Les deux premières citées sont soumises à deux systèmes transporteurs principaux : d'une part, un système d'affinité moyenne et de basse capacité représentant 1 à 10 % de celle rapportée pour les globulines humaines ; d'autre part, un système de basse affinité et de haute capacité dont les constantes d'association sont identiques à celle de la sérum-albumine humaine. Il n'existe qu'un seul système chez *Raja radiata*. Un système transporteur de haute affinité de type transcortine n'est pas rapporté pour ces espèces.

Les hormones sexuelles ont une structure de type stéroïde dont l'origine semble être le cholestérol, présent à des taux importants chez les Poissons (82).

Des études, plus complètes et moins spécifiques d'une ou plusieurs espèces, ont porté sur l'insuline des Poissons. Cette molécule présente une identité immunologique avec l'insuline des Mammifères, pour de nombreuses espèces (126). Des études structurales ont été réalisées pour cette hormone (80).

5°) Les protéines de la coagulation :

La coagulation du sang chez les Poissons est fondamentalement identique à celle existant chez les Mammifères (65). Les molécules solubles de fibrinogène sont transformées en fibrine insoluble par la thrombine. Apparemment, toutes les protéines ont un certain degré de spécificité d'espèces mais les facteurs de la coagulation ne sont pas originaux à ces espèces.

Ainsi les fibrinogènes des Poissons peuvent être transformés en fibrine par la thrombine des Mammifères et la thrombine de Lamproie coagule le fibrinogène des Mammifères, cependant, un peu moins rapidement que son propre fibrinogène (34).

Les travaux de FIELD et coll. (44) donnent les taux plasmatiques du fibrinogène de la Carpe : 2,3 g/l., et de la Truite : 2,2 g/l.

6°) Les enzymes plasmatiques :

Il serait fastidieux d'énumérer les différents enzymes présents dans le plasma des Poissons et nous ne nous bornerons qu'aux molécules enzymatiques les plus importantes.

ODENSE, ALLEN et LEUNG (101) ont montré que la lactico-deshydrogénase de *Clupea harengus* peut prendre différentes formes identifiabiles par

électrophorèse. Les profils obtenus sont sous contrôle génétique (127) et ne sont pas affectés par l'environnement. La fréquence des allèles est différente d'une population à l'autre ce qui permet de caractériser les populations par l'étude des diagrammes électrophorétiques de cet enzyme.

La présence d'estérase a été décelée dans les plasmas de Brochet, *Esox lucius*, de Morue, *Gadus morhua*, d'Anguille, *Anguilla anguilla*, de Maquereau, *Scomber scomber* et d'un Squal, *Squalus acanthias* (3). Chez toutes ces espèces, il existe une cholinestérase présente à faible concentration.

Les phosphatases acides et alcalines ont été dosées dans le plasma de certains Poissons, et ceci au cours de la croissance de l'animal, montrant ainsi une augmentation jusqu'à l'état adulte (98, 99, 100). Il en est de même pour l'amylase (26). La recherche des transaminases sériques a été effectuée également. Il y a dans le plasma de la Truite arc-en-ciel les deux enzymes SGOT et SGPT (56). Une activité oxydasique a été dosée dans le plasma de la Carpe. Elle est environ le tiers de celle rencontrée dans le plasma humain (55).

Arrivés au terme de cet exposé, il nous faut souligner une fois encore l'extrême complexité des problèmes posés par les protéines plasmatiques des Poissons. Cette complexité résulte, d'une part, de nombreux facteurs naturels ou artificiels pouvant influencer sur le milieu extra-cellulaire du Poisson et d'autre part, la totale originalité des protéines plasmatiques bien que permettant l'utilisation des techniques générales d'analyse, pose un délicat problème d'interprétation.

Malgré le grand nombre d'études relatives aux protéines plasmatiques des Poissons, la multiplicité des espèces et surtout les grandes différences existant entre elles ne permettent pas de dégager de vue d'ensemble sur ce sujet.

Il faut s'en tenir le plus souvent à l'étude de cas particuliers et les résultats obtenus pour une espèce déterminée dans des conditions expérimentales précises, ne peuvent être comparés à d'autres qu'avec circonspection.

CHAPITRE II

MATERIEL ET TECHNIQUES

ANIMAUX ET PRELEVEMENTS

Les Truites arc-en-ciel d'élevage, *Salmo gairdnerii* Richardson, avaient un poids compris entre 160 et 250 grammes. Elles étaient âgées d'un an et demi à deux ans et ne présentaient aucun signe de maturité sexuelle.

Elles ont été livrées directement au Laboratoire par l'Etablissement de Pisciculture de SAINT SAVIN (Isère), par camion citerne pourvu d'une alimentation en oxygène. Chaque lot de livraison comprenait environ quarante truites.

Certaines truites présentaient le caractère "saumoné" c'est-à-dire avaient la chair et le plasma rosé. Cet aspect est obtenu artificiellement pendant l'élevage par une nourriture appropriée. La présence de ce pigment dans le plasma ne gêne pas les études que nous avons effectuées, nous n'en n'avons donc pas tenu compte.

Les animaux ont séjourné au Laboratoire dans un bac en matière plastique de 200 litres environ, alimenté en eau courante. La température de l'eau était de $12 \pm 1^{\circ}$. Les truites étaient régulièrement alimentées à l'aide de granulés (TROUVIT des Etablissements TROUV. PROVINS FRANCE).

Les expériences avaient lieu entre le cinquième et le vingtième jour suivant l'arrivée des animaux. Dans les cas où les animaux ont été conservés plus longtemps, nous avons constaté la mort de plusieurs d'entre eux et des modifications sur ceux restant. Ces poissons présentaient une décoloration des branchies. Les prises de sang ont révélé des hémocrits faibles et les électrophorèses des protéines plasmatiques ont montré une diminution nette de la concentration de chaque fraction protéique et une absence du fibrinogène. Les essais que nous avons réalisés sur ces plasmas n'ont pas été retenus dans les résultats que nous présentons.

Avant les prélèvements, les animaux ont été anesthésiés par immersion dans un bac contenant de la Tricaine méthane sulfonate de Sodium (MS 222 SANDOZ), à la dose d'environ 1 gramme pour 10 litres d'eau (83). Les prélèvements sanguins ont été effectués par ponction intracardiaque, en introduisant une aiguille (12/50) dans la région rétro-operculaire. Le sang a été directement recueilli dans un tube à centrifuger sur anti-coagulant, (Anticlot Delagrangé). La centrifugation immédiate a permis de recueillir un volume plasmatique de 1 à 2 ml en moyenne. Les prélèvements destinés aux dosages du Cuivre ont été réalisés avec des aiguilles siliconées. Pour l'obtention du plasma et du sérum du même animal, nous avons procédé comme suit : le sang est d'abord recueilli sur tube sec jusqu'à un volume d'environ 1 ml, puis on poursuit le prélèvement en recueillant le sang sur un tube contenant l'anticoagulant. Le prélèvement destiné à obtenir le sérum est laissé à température ambiante jusqu'à formation du caillot, c'est-à-dire environ 1 heure. La prélèvement du sérum après centrifugation est délicat du fait de la grande fragilité des hématies ; l'hémolyse est fréquente. Dans tous les cas, le volume de sérum recueilli est faible et ne peut être utilisé à d'autres fins que l'électrophorèse.

Parfois les animaux mâles et femelles ont été étudiés séparément. Le sexe a été déterminé après sacrifice de l'animal par examen direct des gonades selon les critères de BOUGIS (15).

A côté de la Truite arc-en-ciel d'élevage, nous avons étudié les diagrammes électrophorétiques des protéines d'autres poissons de différentes espèces. Ceux-ci ont été pêchés dans la région Lyonnaise ou achetés chez un poissonnier. Il s'agit de :

- trois Percidés :

- La Perche, *Perca fluviatilis*
- La Perche soleil, *Eupomotis gibbosus*
- Le Black-bass, *Micropterus salmoides*

- quatre Cyprinidés :

- La Carpe, *Cyprinus carpio*
- La Tanche, *Tinca tinca*
- Le Chevesne, *Leuciscus cephalus*
- Le Rotengle, *Scardinius erythrophthalmus*

- un Siluridé :

- Le Poisson-chat, *Ameiurus nebulosus*

- un Esocidé :

- Le Brochet, *Esox lucius*

Pour des raisons matérielles faciles à comprendre, en particulier, pour les espèces sauvages, les études ont été faites sans tenir compte de

la standardisation des animaux utilisés. Les tailles, les poids, le sexe n'ont pas été notés pour chacune des expériences.

TECHNIQUES

I - METHODES DE DOSAGES

1°) Dosage des protéines :

a - Méthode colorimétrique :

Nous avons dosé les protéines totales par la méthode du "biuret rapide" (124). La réaction est effectuée sur 50 microlitres de plasma. Nous avons préféré cette technique à celle utilisant le réactif de GORNALL, pour sa rapidité d'exécution sur de très petites quantités d'échantillon. De plus, l'addition de cholate de Sodium permet d'obtenir un milieu absolument limpide. Ceci nous a été très utile dans le cas du dosage des protéines plasmatiques où un trouble dû à la forte concentration en lipoprotéines était parfois constaté.

Le choix d'un étalon convenable a retenu notre attention. Nous avons comparé les résultats obtenus avec des solutions d'albumine humaine, d'ovalbumine, de sérums étalons titrés en protéines: Labtrol (Biolyon) et Versatol (Précibio). Nous avons finalement retenu la solution titrée Labtrol qui, à concentration supposée égale donne les densités optiques les plus élevées.

b - Méthode spectrophotométrique :

Nous avons utilisé la méthode d'absorption dans l'ultra-violet, caractéristique des acides aminés aromatiques. Dans les conditions de pH où nous avons opéré, le maximum d'absorption se situait à 280 nm (Spectrophotomètre DB BECKMAN). Nous avons utilisé cette technique essentiellement pour tracer le diagramme d'élution de la gel-filtration. Elle a l'avantage d'être très sensible dans l'intervalle de concentration des protéines de l'éluat.

2°) Dosage des fractions lipidiques des Lipoprotéines :

Nous avons évalué les lipides totaux par méthode pondérale après extraction selon la technique de DELSAL (29). Compte-tenu du volume d'échantillon nécessaire, nous avons dû grouper les plasmas deux à deux pour effectuer le dosage.

Les lipides sont extraits par le mélange méthylal-méthanol dans les proportions 3/1. Le filtrat est évaporé au bain-marie à 60° sous un courant d'azote. Le résidu obtenu est repris par le méthylal pur. La solution est à nouveau filtrée. Le filtrat est recueilli dans un erlenmeyer taré, où il est à nouveau évaporé. L'ensemble est alors placé dans une étuve réglée à 110°, pendant une heure. La pesée du résidu lipidique est faite jusqu'à poids constant.

Des essais de chromatographie en couche mince ont été réalisés sur les extraits lipidiques totaux d'après la technique de BISERTE (10) modifiée. Le résidu lipidique est repris par un volume de mélange chloroforme-méthanol (2/1) tel que la concentration en lipides soit de 20 g/l.

Dans cette solution, les phospholipides sont estimés par dosage du phosphore (9). La valeur des phospholipides est obtenue en multipliant par 25 le poids de phosphore dosé.

Les autres fractions sont évaluées après séparation chromatographique sur plaque de gel de silice. (SCHLEICHER et SCHÜLL F 1500) selon la technique de BISERTE. Nous avons légèrement modifié le mélange solvant : éther de pétrole-éther éthylique-acide acétique (120/20/2) qui permet une séparation plus nette des fractions.

Sur une plaque de 20 cm, on réalise un dépôt de 100 microlitres sur une longueur de 8 cm et à côté, un dépôt de 50 microlitres sur une longueur de 4 cm. Ce deuxième dépôt est utilisé pour la révélation des fractions par coloration à l'Amido-Schwarz : immersion pendant 10 minutes dans une solution d'amido-Schwarz à 2,5 % dans l'acide acétique à 20 % et décoloration par bains successifs dans l'eau acétique à 5 %. Les fractions ainsi repérées sont dosées après avoir été remises en solutions par les solvants appropriés :

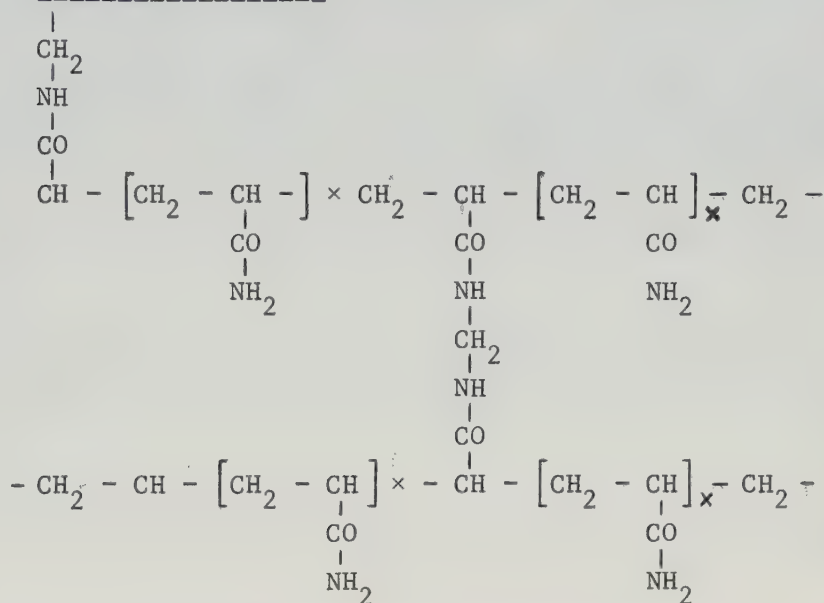
- Technique de GALETTI pour les triglycérides (50) à l'aide des réactifs Haury par rapport à un étalon trioléine (coffret HAURY. FUMOUEZE)
- Méthode de MONNET (93) pour le dosage du cholestérol libre, et des esters du cholestérol (expression des résultats en oléate de cholestérol).

II - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE : DISC ELECTROPHORESIS

Le gel de polyacrylamide est utilisé comme support pour les électrophorèses sur plaque et pour les électrophorèses sur colonne. Cette dernière technique due à RAYMOND (112) d'une part et à ORNSTEIN (102) et DAVIS (27) d'autre part, montre par rapport aux autres méthodes, un excellent pouvoir de résolution.

1°) Généralités :

a - Composition du gel :



Structure du gel de polyacrylamide (90)

La polymérisation de l'acrylamide de la formule $\text{CH}_2 = \text{CH}-\text{CONH}_2$ en présence de catalyseurs conduit à la formation d'un polymère à longue chaîne. Cette synthèse en présence de N-N' méthylène bis-acrylamide comme co-polymérisateur, soit d'un composé où les atomes d'Azote de la fonction amide sont substitués, provoque la rupture d'un certain nombre de liaisons hydrogène. Cet aménagement donne au polymère ses propriétés d'élastomère. Les liaisons hydrogène restantes forment des pontages intermoléculaires ou réticulation. L'introduction d'un très petit nombre de ponts entraîne une diminution notable de la solubilité et permet la formation d'un gel. Cependant, le polymère formé n'a pas un taux de réticulation suffisamment élevé pour être totalement insensible à l'influence du

solvant. Il se gonfle par fixation d'une proportion variable de celui-ci, cette fixation étant directement proportionnelle au degré de réticulation.

Les catalyseurs de polymérisation utilisés sont des systèmes redox capables de fournir des radicaux libres tels que perfulfate d'ammonium, N N N' N' tétraméthyléthylène diamine ou TEMED et riboflavine - TEMED comme système photocatalytique (79). L'oxygène moléculaire, le froid, certains ions métalliques, peuvent inhiber ou même empêcher la polymérisation chimique (104).

b - Principe de l'électrophorèse :

L'électrophorèse en disque en gel de polyacrylamide est d'une part, une méthode de concentration des protéines d'un milieu biologique, et, d'autre part, une technique de séparation de ces protéines. Cette séparation est faite en fonction de leur charge électrique mais aussi de leur encombrement stérique par suite de l'effet de tamisage moléculaire exercé par les mailles du gel.

La méthode décrite par ORNSTEIN et DAVIS utilise trois gels superposés : un gel échantillon, un gel de rassemblement et un gel de séparation. Ces trois gels sont différents par leur concentration en acrylamide et par leur pH.

Le gel échantillon sert à inclure le produit biologique dans une phase susceptible de se polymériser. Des modifications techniques permettent la suppression de ce gel, l'échantillon étant alors introduit sous une mince couche d'une solution concentrée de saccharose.

Les protéines de l'échantillon réparties de façon homogène dans le gel précédent vont, en traversant le gel de rassemblement se concentrer progressivement pour pénétrer finalement dans le gel de séparation sous forme d'un mince disque.

Le mécanisme de la concentration est le suivant :

Soit deux sels d'un même anion superposés verticalement, $A^+ R^-$ et $B^+ R^-$, les mobilités électrophorétiques μ des cations étant telles que $\mu A \neq \mu B$ et $\mu A > \mu B$. Si on applique aux deux extrémités du tube vertical une différence de potentiel, le pôle négatif étant du côté de l'ion le plus mobile, la migration électrophorétique se manifeste par un déplacement du front de séparation, sans mélange des deux espèces. Ce front de séparation se dirige vers le pôle négatif. Le cation A^+ va occuper de ce fait un espace de plus en plus restreint, il se trouve donc concentré. Le cation B^+ occupe au contraire un espace de plus en plus étendu. A chaque niveau du gel, le rapport des concentrations des

deux espèces cationiques est exprimé par la formule :

$$\frac{[A]}{[B]} = \frac{\mu_A}{\mu_A + \mu_R} \times \frac{\mu_B + \mu_R}{\mu_B} \times \frac{L_A}{L_B}$$

où μ est la mobilité électrophorétique
L la charge électrique.

Il en sera de même si 3 cations A^+ , B^+ et C^+ dont les mobilités sont dans l'ordre $\mu_A > \mu_C > \mu_B$, sont superposés dans l'ordre B, C, A. Les cations A^+ et C^+ seront concentrés alors que B^+ sera dilué.

Dans l'électrophorèse en gel de polyacrylamide, les trois ions présents sont en pratique : l'ion Cl^- , la protéine à étudier de mobilité intermédiaire sous forme anionique au pH de l'expérience, et le glycolle, anion lent contenu dans le tampon utilisé.

Dans le gel de séparation, la dimension des mailles du gel ajoute son pouvoir séparateur à la migration électrophorétique classique. En effet, le phénomène observé dans le gel de rassemblement n'a plus lieu car au pH de ce gel -8,9- la mobilité du glycolle est différente. Le gel de séparation peut être constitué par deux gels superposés de concentration différente en acrylamide, le gel de plus grande concentration se trouvant dans la partie la plus basse. Cette méthode permet d'obtenir sur un même gel de séparation toutes les fractions protéiques de mobilités très différentes.

c - Détermination des poids moléculaires :

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide ayant aussi un pouvoir de tamisage moléculaire, il est possible de déterminer les poids moléculaires en fonction de la migration des molécules. De nombreuses formules ont été élaborées par divers auteurs, en vue de faire cette détermination. Nous citerons par exemple les deux équations suivantes :

$$\log m = \log m_0 - (kc MW + a)T \quad (119)$$

$$MW = \frac{\text{constante}}{T_{0,5}^3} \quad (121)$$

où : - T est la densité du gel

- $T_{0,5}$ la densité du gel qui réduit la mobilité libre de moitié

- m_0 la mobilité libre, c'est-à-dire celle obtenue dans un gel théorique de densité 0

- m la mobilité dans un gel de densité T,
- kc le coefficient de réticulation,
- a une constante
- M W la masse moléculaire.

En pratique, la détermination de la masse moléculaire d'une protéine est faite par rapport à une molécule de référence.

La méthode d'électrophorèse en disque en gel de polyacrylamide permet la visualisation de micro-quantités de protéines, de l'ordre de 10 microg. Ceci permet l'utilisation de très petits volumes d'échantillons. Les durées de migration pour les séparations électrophorétiques très fines sont courtes.

La transparence du gel permet l'application de colorations spécifiques, ceci d'autant plus que les préparations sont relativement inertes chimiquement. Les gels peuvent être conservés longtemps dans une atmosphère humide. Outre, ceux synthétisés en présence de détergents et de fortes concentrations d'urée, il existe des préparations permettant d'obtenir des gels pouvant être solubilisés dans des solvants acides ou alcalins. On peut ainsi pratiquer divers dosages sur les solutions obtenues.

d - Electrophorèse en gradient de concentration :

Des plaques de polyacrylamide sont commercialisées, présentant un gradient de concentration en acrylamide. Ce gradient varie pour une longueur de 7 cm de 4 % à 26 % environ. La séparation des protéines est faite selon les mêmes critères que ceux énoncés précédemment, mais le degré variable de réticulation bloque les molécules selon leur encombrement stérique, ce qui correspond grossièrement à leur poids moléculaire. Les durées de migrations sont plus grandes puisqu'il s'agit de laisser se déplacer les protéines jusqu'à ce que les dimensions des pores du gel ne leur permettent plus d'avancer.

2°) Techniques utilisées :

a - Appareillage

Nous avons utilisé un générateur de courant de type ELVI 20 et un bac à électrophorèse "Analytical Acrylophor" PLEUGER, auquel nous avons adjoint un manchon en matière plastique destiné à recevoir de la glace. En effet, en raison de l'échauffement produit au cours de la migration électrophorétique, il nous a semblé préférable de procéder à une réfrigération. L'appareil par lui-même se compose d'une cuve inférieure anodique. Les tubes de séparation mesurant 6,5 cm de long, et 0,8 cm de diamètre, sont insérés dans la partie

supérieure cathodique rendant ce compartiment étanche. Les deux cuves sont superposées pour former la cellule électrophorétique. Les caractéristiques de l'appareil permettent huit migrations électrophorétiques simultanées.

b - Les solutions utilisées :

La technique que nous avons utilisée pour la préparation des solutions et des gels est celle proposée par JUUL (68).

&. Solutions mères pour la préparation des gels

<u>Solution 1</u> HCl N 50,4 ml Tris 30 g Tétraméthyléthylène diamine 0,24 ml Eau qsp 100 ml	<u>Solution 2</u> HCl N 50,4 ml Tris 5,52 g Tétraméthyléthylène diamine 0,5 ml Eau qsp 100 ml
<u>Solution 3</u> Acrylamide 36 g Méthylène bis acrylamide 0,64 g Eau qsp 100 ml	<u>Solution 4</u> Acrylamide 14 g Méthylène bis acrylamide 1 g Eau qsp 100 ml
<u>Solution 5</u> Saccharose 40 g Eau qsp 100 ml	<u>Solution 6</u> Saccharose 60 g Eau qsp 100 ml
<u>Solution 7</u> Persulfate d'ammonium . 0,2 g Eau qsp 100 ml	<u>Solution 8</u> Riboflavine 5,04 mg Eau qsp 100 ml

Ces solutions se conservent au moins un mois à + 4°

& . Composition des différents gels

* Gels de séparation

Les volumes sont donnés en millilitres

	CONCENTRATIONS EN MONOMERE			
	5,5 %	7 %	9 %	12 %
Eau	1,2	0,65	-	-
Sol. 1	1,5	1,5	1,5	1,5
Sol. 3	1,8	2,35	3	4
Sol. 5	3	3	3	3
Sol. 7	4,5	4,5	4,5	3,5

* Gel de rassemblement (3,5 % de monomère)

Solutions	Volumes en ml
2	0,2
4	0,4
6	0,8
8	0,2

* Gel se séparation (3,5 % de monomère)

Solutions	Volumes en ml
2	0,2
4	0,4
5	0,8
8	0,2

&. Solution tampon pH 8,4 pour électrophorèse

Tris (hydroxyméthyl) amino méthane	5 g
Glycocolle	40 g
Eau qsp	1000 ml

La solution tampon est utilisée au 1/4 dans la cuve anodique et telle quelle dans la partie cathodique. On évite ainsi la déformation de la partie inférieure des gels.

c - Préparation des gels :

Les trois gels, gel de séparation, gel de rassemblement et gel échantillon sont coulés successivement dans les tubes d'électrophorèse. Les dimensions des tubes permettent un volume de 1,4 ml pour le gel de séparation. Dans le cas des électrophorèses en gel double, nous avons consacré 0,7 ml à chacune des concentrations. L'addition d'une couche d'eau distillée au-dessus de la solution d'acrylamide, permet de supprimer le ménisque supérieur. La polymérisation du gel de séparation s'effectue en 30 minutes environ, à la température ambiante ; cependant, le début de la réaction provoque un dégagement de chaleur risquant d'entraîner la formation de bulles dans le gel. Pour cette raison, il est préférable de mettre les tubes au réfrigérateur pendant les premiers instants de la polymérisation. La fin de la réaction est visualisée par l'amplification de l'interface gel-eau.

Le gel de rassemblement est coulé après essorage de la face libre du gel de séparation ; la polymérisation est faite par exposition aux radiations ultra-violettes fournies par une lampe. Il en est de même pour le gel échantillon. Ces deux gels occupent chacun un volume de 0,15 ml.

d - Caractéristiques des échantillons déposés :

Le milieu biologique à étudier est introduit dans le gel-échantillon, avant sa polymérisation à l'aide d'une seringue Hamilton de 10 ou 100 μ l. L'homogénéisation du gel est réalisée à l'aide d'une fine baguette de verre. La polymérisation du gel est effectuée comme il est dit précédemment.

Exception faite, bien entendu, des échantillons nécessitant un traitement préalable, nous avons utilisé des plasmas ou des sérums frais, c'est-à-dire prélevés dans les deux heures précédant l'expérience.

Les quantités déposées ont été les suivantes :

- pour les protéines : 3 μ l soit approximativement 100 μ g de protéines.
- pour les glycoprotéines : 20 μ l
- pour les lipoprotéines : 20 μ l

Pour les échantillons ayant subi un traitement, le volume déposé à l'électrophorèse a été calculé de façon à ce que leurs concentrations correspondent aux valeurs précédentes.

e - L'électrophorèse

Les tubes sont placés dans la cuve. Avant la mise en fonctionnement du dispositif, il faut s'assurer qu'aucune couche d'air n'empêche le contact entre les deux extrêmités du gel et la solution tampon. De même, la partie inférieure du gel doit affleurer l'extrémité du tube de séparation car, au cours de l'électrophorèse, il se produit un dégagement gazeux et les bulles formées risquent de s'accumuler dans l'espace laissé libre. Les différences de potentiels et les temps utilisés ont été les suivants :

- pour le gel simple 9 %
 - 80 volts pendant 30 minutes
 - 160 volts pendant 90 minutes.
- pour les double-gels 5,5 % - 12 % et simple gel 5,5 %
 - 80 volts pendant 60 minutes
 - 160 volts pendant 150 minutes.

La solution tampon n'est pas réutilisable. A la fin de l'électrophorèse, les gels sont démoulés par injection d'eau entre le gel et le tube à l'aide d'une seringue. Les gels sont alors prêts à subir les colorations désirées.

f - Techniques de révélation

&. Coloration des protéines

Elle est réalisée par immersion dans une solution d'Amido-Schwarz à 2,5 % dans l'acide acétique à 20 % pendant 10 minutes. L'excès de colorant est éliminé par des lavages successifs dans l'eau acétique à 5 % jusqu'à décoloration totale du fond. Celle-ci est obtenue après environ 48 heures avec 8 bains successifs. Les gels sont conservés dans l'eau acétique à 5 %. La coloration reste stable plusieurs mois.

&. Coloration des lipoprotéines

Nous avons utilisé la technique de PRAT (110) modifiée par nous-même. La coloration est obtenue en 4 heures par une solution de Noir Sudan à 0,6 g % dans l'acide acétique à 20 %. La dissolution du colorant nécessite l'addition préalable de 6 ml d'acétone.

La décoloration est obtenue par immersion pendant 5 heures dans un mélange à parties égales d'éthanol à 90° et d'acide acétique à 20 %. Les gels sont conservés dans l'eau acétique à 5 %. La coloration évolue lentement vers le brun mais sans modification de l'aspect du diagramme.

&. Coloration des glycoprotéines

La mise en évidence des glycoprotéines est réalisée par la réaction de SCHIFF après oxydation périodique des oses, selon la technique de FELGENHAUER (43).

L'oxydation périodique est provoquée par immersion des gels pendant 16 heures dans la solution de composition suivante :

- acide périodique 2 g
- eau distillée 86 ml
- acide acétique 10 ml
- acide chlorhydrique conc .. 2,5 ml
- acide trichloracétique 1 g

Les gels sont ensuite lavés dans une solution d'acide acétique à 10 % contenant 1 g % d'acide trichloracétique. Le lavage est effectué par 3 bains successifs dans cette solution, l'ensemble de cette manipulation ayant une durée d'environ 8 heures. La coloration dans la réaction de Schiff (MERCK Réf. 9034) dure 16 heures. Les gels sont alors lavés deux fois 2 heures dans la solution de bisulfite de Potassium suivante :

- bisulfite de potassium 1 g
- acide chlorhydrique conc .. 20 ml
- eau distillée 980 ml

Les préparations sont conservées dans l'eau acétique à 5 %. La coloration n'est pas stable : elle a tendance à diffuser et à s'estomper ; il est préférable de faire un cliché photographique dans les 24 heures.

g - Mesure de l'intensité de coloration

Des essais ont été effectués à l'aide du densitomètre enregistreur, Chromoscan (JOYCE. LOEBL). Pour les colonnes d'acrylamide, il faut opérer en transmission, avec un support d'échantillon et un système de détection spéciaux.

Toutefois, le réglage correct de la ligne de base s'est avéré très problématique et nous n'avons pas pu réaliser d'analyse quantitative par intégration. Cette technique, dans ce cas précis, n'a donc qu'un intérêt d'ordre qualitatif.

h - Découpage des gels :

Pour la recherche de la transferrine, nous avons dû procéder au découpage des gels colorés et non colorés. Les sections ont été réalisées à l'aide d'une lame de rasoir. Dans le cas des gels colorés, nous avons séparé chacune des bandes autant qu'il était possible de le faire. Les gels non colorés, ont été divisés en fragments par comparaison avec un gel coloré témoin.

3°) Electrophorèse en gradient de concentration d'acrylamide :

Nous avons utilisé une unité électrophorétique du type unité GRADIPORE simple n° 342 000, équipée d'un système de refroidissement. Les plaques adéquates présentaient un gradient concave de 4 à 26 % d'acrylamide. Leurs dimensions étaient 70 x 70 x 3 mm.

Les échantillons sont déposés sur une largeur de 4 mm environ dans les encoches d'un peigne prévu à cet effet. Les volumes déposés ont été de 20 µl de plasma dilué au 1/2. L'échantillon est additionné d'une solution de glucose pour en augmenter la densité et de bleu de bromophénol. Il est introduit sous le tampon, remplissant les encoches du peigne.

Le tampon utilisé est un tampon Tris-borate pH = 8,28.

La durée de migration est de 16 heures environ, sous une tension de 80 volts correspondant à 40 mA environ. Les gels sont décollés sous l'eau ou sous une couche d'eau glycinée à 10 %. Les gels peuvent être coupés longitudinalement et chacun des dépôts peut recevoir ainsi une coloration spécifique.

III - CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE DEXTRAN

1°) Généralités

Le gel de dextran se présente comme une structure polyosidique tridimensionnelle. La présence de nombreux groupements hydroxyles permet le gonflement du gel en présence d'eau.

Les molécules dont la taille est supérieure aux mailles du gel sont exclues, c'est-à-dire, qu'elles ne pénètrent pas dans les pores ; elles ne sont pas retardées par la filtration. Au contraire, les molécules dont la taille est inférieure aux dimensions des pores, pénètrent dans ceux-ci et leur filtration est ralentie.

Cette technique permet de séparer les molécules d'après leur dimension dans une zone de poids moléculaires qui dépend de la finesse des mailles du réseau. Les molécules sont éluées par ordre de poids moléculaires décroissants.

Le degré de réticulation s'exprime par l'eau de gonflement ou indice de rétention d'eau qui varie de 1 ml d'eau par gramme de Sephadex G 10 à 20 ml par gramme de Sephadex G 200. (Sephadex Pharmacia UPSALA SUEDE).

Pour les substances sans aucune charge, l'eau distillée peut être utilisée comme éluant. Pour les substances contenant quelques groupes porteurs de charges, il est préférable d'employer un éluant de force ionique au moins égal à 0,02 car le gel comporte un petit nombre de groupements carboxyliques qui provoquent une légère absorption de cations et une légère exclusion d'anions.

Cette technique de fractionnement des protéines a pour application la détermination des poids moléculaires (1, 125). De nombreux travaux ont montré que les volumes d'éluion des protéines globulaires dépendaient très largement de leur poids moléculaire. Ils sont dans un domaine très étendu une fonction sensiblement linéaire du logarithme de la masse moléculaire (2, 18). La méthode peut être utilisée aussi pour la détermination des poids moléculaires des peptides, de macromolécules non protéiques et des enzymes (73).

En fait, la relation entre le poids moléculaire et le volume d'éluion étant différente pour chaque type de molécules, il est nécessaire d'établir une courbe d'étalonnage dans chacun

des cas. Cette technique de fractionnement des plasmas couplée à la chromatographie sur résine échangeuse d'ions permet l'isolement et la purification d'une protéine déterminée (52).

2°) Technique utilisée

a - Appareillage

Nous avons utilisé le gel Sephadex G 200 dont le gonflement a été effectué à température ambiante dans l'eau distillée pendant 4 jours. Des essais de gel-filtration ont été réalisés sur trois colonnes mesurant respectivement 50, 100 et 180 cm, toutes trois ayant un diamètre de 2,5 cm. La hauteur du gel dans chacune a été respectivement de 45, 95 et 175 cm. La colonne était munie d'un applicateur d'échantillon (Pharmacia Upsala, SUEDE), celui-ci se révélant indispensable pour effectuer une chromatographie ascendante.

Le remplissage de la colonne a été réalisé par la suspension du gel gonflé, chauffée à ébullition. A cette température, les gaz dissous sont libérés et il ne se produit pas de bulles lors du refroidissement de la colonne.

Le gel est ensuite rincé avec le tampon d'élution.

b - L'éluant et dispositif d'élution

L'éluant est constitué par la solution tampon de formule suivante :

- Tampon Tris-HCl, pH 7,5, KCl 0,1 M

Tris(hydroxyméthyl)aminométhane	6,05 g
Acide chlorhydrique 0,1 N	403 ml
Chlorure de potassium	7,45 g
Eau qsp	1000 ml

Nous donnerons seulement les caractéristiques de la colonne 180 × 2,5 cm, celle-ci nous ayant servi à obtenir les résultats présentés.

volume mort : 280 ml

débit # 8 ml par heure.

Ce débit était obtenu en plaçant le réservoir contenant la solution tampon à environ 220 cm au-dessus du niveau de sortie de la colonne.

Les volumes d'échantillons introduits, variables selon les essais, ont été de 2,5 à 5 ml. L'injection dans l'applicateur a été effectuée à l'aide d'un accessoire de notre fabrication. Ce dispositif était constitué d'une pipette munie à son extrémité effilée d'une aiguille à injection dont le joint plastique a été soudé par chauffage modéré de la pointe de la pipette.

La colonne de chromatographie était reliée à un collecteur de fractions, type LKB 7000 ULTRO RAC. L'ensemble des appareils a été placé dans une chambre réfrigérée à + 4°, durant toutes les expériences.

Entre chaque filtration, la colonne a été rincée par un volume d'éluant au moins égal à deux fois le volume mort de celle-ci.

c - Les fractions d'élution

Le tampon d'élution a été recueilli par fraction de 66 gouttes ce qui représente un volume d'environ 4 ml.

La teneur en protéines des fractions obtenues a été déterminée par spectrophotométrie à 280 nm. Les densités optiques de chacune d'elles sont reportées sur un graphique, permettant d'obtenir ainsi le diagramme d'élution.

Nous avons ensuite groupé les fractions selon différents modes :

- soit en reconstituant la totalité des pics, la partie ascendante ou la partie descendante pour chacun d'eux,
- soit en prenant arbitrairement des groupes de 10 tubes consécutifs.

Chaque volume ainsi formé a été concentré par ultra-filtration et ramené au volume de l'échantillon déposé dans la colonne ou à un volume moindre selon la nature des dosages envisagés.

L'appareil que nous avons à notre disposition était du type DIAFLO ULTRA-FILTERS (AMICON) muni de membranes semi-perméables UM 10 de 20 mm de diamètre. Les molécules retenues sont dans ces conditions d'un poids moléculaire supérieur à 10.000

Les filtrations ont été effectuées sous une pression d'azote de 2,6 bars.

Le débit de l'appareil était alors d'environ 15 ml par heure.

IV - PRECIPITATIONS PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

Nous avons utilisé deux modes opératoires différents pour étudier la solubilité des protéines plasmatiques dans le sulfate d'ammonium.

L'un consiste à traiter le plasma total par des solutions de concentrations croissantes en sulfate d'ammonium, l'autre est la technique de précipitation fractionnée.

Dans les deux cas, nous avons utilisé une solution saturée de sulfate d'ammonium.

1°) Traitement du plasma total

Chaque essai a été effectué sur 0,2 ml de plasma. Les concentrations de sulfate d'ammonium ont été, in situ, respectivement de 25, 35, 40, 45, 50, 55 et 60 % de saturation. Après un repos de 15 minutes, les essais sont centrifugés. Le surnageant est éliminé par aspiration à la trompe à vide. Les précipités sont remis en suspension dans les solutions correspondantes de sulfate d'ammonium. Après centrifugation et nouvelle élimination du surnageant, le précipité est remis en solution dans 1,6 ml de sérum physiologique. De cette façon, les protéines sont diluées au 1/8. Nous avons donc déposé à l'électrophorèse des volumes d'échantillons de 24 μ l.

2°) Précipitations fractionnées

Le volume de plasma traité est de 2 ml. Chaque précipitation est effectuée selon le schéma précédent, la première précipitation étant faite sur le plasma total et les suivantes sur les surnageants obtenus après chaque précipitation.

Chaque précipité lavé est remis en solution dans un volume de sérum physiologique tel que les protéines séparées soient à une concentration identique à celle qu'elles avaient dans le plasma. Les concentrations utilisées en sulfate d'ammonium ont été de 25, 40, 60 et 65 % de saturation.

Après un temps de contact de 15 minutes, les centrifugations ont été réalisées à 10.000 tours/minute (8000 g) dans une centrifugeuse thermostatée MSE HS 18, à la température de 15°, pendant 10 minutes environ. Pour l'électrophorèse, les volumes déposés ont été identiques à ceux du plasma total, c'est-à-dire de 3 μ l.

V - METHODES D'ETUDE DE QUELQUES CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES DES PROTEINES PLASMATIQUES.

Nous avons étudié les critères de solubilité dans l'acide perchlorique, et la résistance des protéines au froid et à la chaleur. Après avoir subi les divers traitements, les protéines sont soumises à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide.

1°) Solubilité dans l'acide perchlorique

0,5 ml de plasma sont dilués dans 1,9 ml de sérum physiologique. L'addition de 0,8 ml d'une solution d'acide perchlorique 0,8 N permet la précipitation des fractions protéiques non solubles à la normalité du milieu c'est-à-dire 0,2 N. Elles sont séparées par centrifugation. Le surnageant est neutralisé par une solution de bicarbonate de potassium 0,8 N dans les proportions de 2,4 ml de surnageant pour 0,6 ml de solution de bicarbonate. Le perchlorate de potassium formé est insoluble et éliminé par centrifugation. Dans le surnageant, les protéines solubles se trouvent diluées au 1/8, le dépôt à l'électrophorèse sera donc de 24 μ l.

2°) Résistance à la chaleur

Deux échantillons d'un plasma dilué au 1/8 dans du sérum physiologique sont placés dans un bain-marie dont la température est réglée à 55°, pendant 30 et 120 minutes respectivement. 24 μ l des préparations obtenues sont soumis telles quelles à l'électrophorèse.

3°) Influence du mode de conservation

Nous avons conservé pendant 4 jours un même plasma dans un réfrigérateur à + 4°, dans un congélateur à - 30°, et à la température ambiante à + 20° environ. Des électrophorèses comparatives ont été réalisées sur chacun des trois échantillons (dépôt 3 μ l).

VI - METHODE D'ETUDE DES ACIDES AMINES DU FIBRINOGENE

Les acides aminés constitutifs du fibrinogène sont libérés par hydrolyse acide puis analysés par chromatographie.

La technique utilisée est celle de la séparation par chromatographie liquide sur résine échangeuse d'ions selon MOORE et STEIN (95). Par voie automatique, les acides aminés d'un milieu biologique débarrassé au préalable de toutes les substances pouvant interférer, sont fixés sur des résines anioniques et successivement élués par des tampons de pH et de force ionique croissants.

Les acides aminés élués sont colorés par la technique à la ninhydrine et au chlorure stanneux (94) et dosés par spectrophotométrie. Les variations de densité optique sont directement enregistrées.

1°) Préparation des échantillons

- Isolement du fibrinogène

Le fibrinogène est isolé à partir de 5 ml de plasma par précipitation au sulfate d'ammonium à 25 % de saturation. Le précipité est lavé ; sa pureté est vérifiée par électrophorèse en gel de polyacrylamide.

- Elimination du sulfate d'ammonium

Il est nécessaire d'éliminer les ions NH_4^+ restant dans le milieu, ceux-ci donnant la réaction avec la ninhydrine.

Le précipité est mis en solution dans 100 ml de sérum physiologique. La solution est dialysée dans un boyau cellulosique contre du polyéthylène-glycol. Le dialysat obtenu est ramené à 50 ml avec du sérum physiologique et soumis à l'ultra-filtration jusqu'à un volume final de 3 ml. L'appareillage a été précédemment décrit dans le paragraphe III concernant la gel-filtration. Par ces traitements successifs, le sulfate d'ammonium est totalement éliminé du milieu.

- Hydrolyse

La solution de fibrinogène est additionnée de 3 ml d'acide chlorhydrique concentré. Le mélange est introduit dans une ampoule de verre que l'on scelle sous vide. L'ensemble est alors placé 48 heures dans une étuve à 105°C.

- Injection de l'échantillon

Le pH de l'hydrolysate est ramené à 2,2 à l'aide d'une solution de soude concentrée. Les échantillons sont introduits dans la chambre d'injection à l'aide d'une seringue, sous un volume de 0,8 ml, les échantillons étant préalablement filtrés. (SWINNEX-MILLIPORE dimensions des pores : 0,22 microns).

2°) Appareillage

Nous avons utilisé un auto-analyseur JEOLCO type 5 AH permettant l'analyse simultanée de six échantillons biologiques. L'appareil comprend essentiellement :

- un système d'injection des échantillons permettant leur stockage, directement relié aux colonnes de séparation.
- deux colonnes thermostatées contenant les résines échangeuses de cations. La colonne 1 permet la séparation des acides aminés basiques ; la colonne 2 permet la séparation des acides aminés acides et neutres.
- une série de réservoirs contenant les divers tampons d'élution (dont le pH doit être exact au 1/100ème) et la soude servant à la régénération des résines. Ces réservoirs sont en communication directe avec les réservoirs d'échantillons et les colonnes de séparation par des valves d'échanges.
- un réservoir contenant le réactif à la ninhydrine en communication avec les sorties de colonne.
Le réactif a la composition suivante :

tampon acétate de sodium 4M	250 ml
méthyl-cellosolve (exempt de peroxydes).....	750 ml
ninhydrine	20 g
chlorure stanneux SnCl_2 , 2 H_2O	0,4 g

Le méthyl-cellosolve, sous atmosphère d'azote, et la ninhydrine doivent être conservés à + 4° et à l'abri de la lumière.

- une série de pompes (pompe de tampons et pompe de détection), permettant l'écoulement constant et contrôlé des divers réactifs.
- un bain de réaction dans lequel a lieu le développement de la coloration des acides aminés.
- un spectrophotomètre à double faisceau et à deux longueurs d'onde (440 et 570 nm), permettant en continu la mesure de la densité optique des effluents du bain de réaction.
- un enregistreur permettant l'inscription simultanée des variations de densité optique aux deux longueurs d'onde et à trois sensibilités différentes.

3°) Conditions de travail

	COLONNE 1	COLONNE 2
Volume échantillon	0,8 ml	0,8 ml
Phase stationnaire	AMINEX A5	AMINEX A4
Phases mobiles	Tampons citrate pH 4,25 - 0,35 N pH 5,28 - 0,35 N	Tampons citrate pH 3,23 - 0,2 N pH 4,25 - 0,2 N
Phase de régénération	NaOH 0,2 N	NaOH 0,2 N
Dimensions des colonnes	0,8 × 15 cm	0,8 × 70 cm
Température des colonnes	30° - 55°	30° - 55°
Débit des pompes :		
- Tampon	0,83 ml/mn	0,83 ml/mn
- Echantillon	0,21 ml/mn	0,21 ml/mn
- Ninhydrine	0,42 ml/mn	0,42 ml/mn

- . Temps de réaction : 7 minutes
- . Température de réaction : 100°
- . Vitesse d'enregistrement : 12 cm/heure
- . Longueur d'onde : 570 nanomètres
- : 440 nanomètres
- . Sensibilités : 1 et 3

4°) Exploitation des résultats

La teneur en acides aminés d'un échantillon se détermine par calcul de la surface des pics en la comparant aux surfaces des pics d'une solution standard d'acides aminés. La concentration de chaque acide aminé présent dans la solution standard CALBIOCHEM est de $2,5 \pm 0,05$ micromoles par millilitre. Cette solution est diluée au 1/20° dans HCl 0,01 N et injectée sous un volume de 0,8 ml. Ainsi, chaque pic correspond à 0,1 micromole d'acide aminé.

Les acides aminés présents dans la solution standard type AA 5 CALBIOCHEM sont les suivantes :

- Ala, Arg, Asp, Cys, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Tyr, Val. La solution contient en plus du sulfate d'ammonium.

Les résultats sont exprimés en micromoles pour 100 micromoles d'acides aminés présents.

VII - RECHERCHE D'UNE CERULOPLASMIQUE

Il nous a été impossible d'utiliser une technique de marquage isotopique. En effet, le cuivre utilisable est le ^{64}Cu de période beaucoup trop courte : 12,8 heures.

Chez l'Homme, le dosage de la céruloplasmine peut être fait par évaluation de l'activité oxydasique du plasma ou du sérum selon la technique de JEROME et GIRAULT (66). Nous avons donc appliqué cette réaction dans le but d'estimer l'activité oxydasique de plasmas de Truite arc-en-ciel par rapport à celle existant dans un plasma humain. Parallèlement, nous avons essayé de localiser cette céruloplasmine, si elle existe, par dosage du cuivre par absorption atomique.

A - RECHERCHE D'UNE ACTIVITE OXYDASIQUE

La technique utilisée est celle de JEROME et GIRAULT (66).

La réaction utilise comme substrat la paraphénylène diamine (PPD), purifiée par cristallisation après solubilisation dans le benzène chaud. Ce composé incolore participe à la réaction sous forme de chlorhydrate de PPD. En présence d'oxydase, et de l'oxygène dissout, la PPD est transformée en un complexe connu sous le nom de base de BANDROWSKI, coloré en violet. L'intensité de cette coloration est évaluée au spectrophotomètre à 545 nm. La réaction est faite en milieu tamponné acide acétique-acétate de sodium à pH 5,6 à la température de 37°, pendant 40 minutes ; ces conditions sont celles appliquées pour évaluer l'activité oxydasique du plasma.

La recherche de l'activité oxydasique a été effectuée en gel de polyacrylamide, sur les fractions protéiques séparées à partir d'un dépôt de 40 μl de plasma. Le temps d'incubation a été alors de 120 minutes. Parallèlement, nous avons effectué des recherches sur un plasma humain.

B - DOSAGE DU CUIVRE PAR ABSORPTION ATOMIQUE

Les dosages ont été effectués sur les plasmas totaux et sur les fractions protéiques précipitées par le sulfate d'ammonium. Nous avons utilisé aussi cette technique pour le dosage du cuivre dans les fractions concentrées obtenues par chromatographie sur gel de dextran.

1°) Généralités

Principe

Un électron à l'état énergétique stable W_0 est susceptible d'absorber un photon de fréquence lumineuse ν_0 et seulement de cette fréquence, pour acquérir l'état énergétique W_1 .

Cette faculté d'absorber exclusivement cette radiation de fréquence déterminée permet de définir la transition électronique et par conséquent l'élément lui-même. De plus, dans le cas d'une vapeur atomique, l'intensité de lumière absorbée est fonction du nombre d'atomes présents dans cette vapeur.

Pour un même atome, il existe un grand nombre de transitions électroniques possibles. Pour des raisons de spécificité et de sensibilité, l'absorption atomique n'utilise que les raies les plus intenses ; parmi celles-ci, les **raies** dites de résonance, c'est-à-dire, celles correspondant au passage d'un électron de son état énergétique fondamental à l'état énergétique immédiatement supérieur.

Dispositif technique

Un spectrophotomètre d'absorption atomique se compose de 4 parties essentielles :

- une lampe à cathode creuse, génératrice de photons lumineux spécifiques du métal à doser.
- un générateur de vapeur atomique.
- un photomultiplicateur pour la mesure de l'intensité lumineuse.
- un dispositif électronique mesurant l'intensité du courant électrique délivré par le photomultiplicateur, l'ensemble est complété par un système d'enregistrement graphique.

2°) Techniques utilisées

Les échantillons ont été utilisés tels quels ou après déprotéinisation par l'acide trichloracétique à 8 %. Dans ce cas, les dosages ont été réalisés sur les surnageants obtenus après centrifugation.

Nous avons utilisé un spectrophotomètre PERKIN-ELMER modèle 303 dont les caractéristiques sont les suivantes :

- température de la flamme 2.000 à 2.300°C, obtenue par le mélange air-acétylène.
- débit de pulvérisation : 5 ml/minute.

La lampe utilisée était une lampe à filament Cu-Mn, dans une atmosphère de Néon ; la tension d'utilisation était de 15 mA. La longueur d'onde utilisée pour le dosage du cuivre est de 3.247 Å.

La sensibilité du dosage est, dans ces conditions de 0,05 µg/ml de cuivre pour 1 % d'absorption.

La gamme d'étalonnage utilisée a été réalisée à l'aide de solutions de nitrate de cuivre dosées respectivement à 1, 0,8, 0,6 0,4, 0,2 µg/ml de Cuivre.

Les lectures ont été faites avec une expansion d'échelle : 3.

VIII - METHODES DE LOCALISATION DE LA TRANSFERRINE PAR ISOTOPE RADIO-ACTIF

Nous avons utilisé le ⁵⁹Fe en vue de caractériser une protéine trans-porteuse de fer.

La présence d'une transferrine chez les Poissons a été démontrée chez plusieurs espèces, comme nous l'avons vu dans le premier chapitre, concernant l'aspect général des protéines plasmatiques. Les travaux de GOT (54) chez la Roussette, et ceux de DRILHON (35) chez le Saumon, entre autres, montrent que cette transferrine n'est pas saturée en atomes de fer, et qu'il existe aussi chez les Poissons, une capacité de liaison de fer. Nous l'avons nous-même évaluée en effectuant des dosages préliminaires sur le plasma de la Truite arc-en-ciel d'élevage.

1°) Dosages préliminaires

Nous avons dosé le fer et la capacité de liaison en fer par la technique utilisant la bathophénantroline telle qu'elle est décrite dans les coffrets HAURY (Laboratoire FUMOUEZ). Les résultats sont exprimés en microgrammes pour 100 ml de plasma.

2°) Etude par le fer radio-actif

L'isotope utilisé est un émetteur γ facile à détecter dont la période assez longue, 45 jours, permet de multiplier les expériences.

Le $^{59}_{26}\text{Fe}$ est désintégré en $^{59}_{27}\text{Co}$ par émission de trois particules β^- respectivement d'énergie 0,271 MeV, 0,462 MeV et pour une très faible part de 1,56 MeV, mais la détection se fera exclusivement grâce aux deux photons γ d'ailleurs assez énergétiques de 1,10 à 1,29 MeV.

a - Solution utilisée

La solution de fer radio-actif nous a été fournie par le Commissariat à l'Energie Atomique sous forme d'une solution de citrate ferrique à pH 5, d'activité 2,08 mCi sous un volume de 2 ml. Nous avons utilisé une dilution au 1/20 de cette solution de manière à obtenir une activité convenant aux diverses mesures effectuées.

b - Saturation de la transferrine

Nous avons effectué deux séries d'expériences. L'une comportait la saturation de la transferrine puis électrophorèse des protéines plasmatiques et comptage de l'activité dans les gels ; l'autre, comportait la saturation de la transferrine par le fer radio-actif puis précipitations fractionnées des protéines par le sulfate d'ammonium et comptage de l'activité des précipités. Nous avons utilisé des proportions différentes de solution radio-active dans chacun des cas.

- pour le comptage de la radio-activité dans les gels, la transferrine a été saturée en fer par addition de 0,1 ml de solution radio-active à 0,3 ml de plasma. La durée du temps de contact a été de 60 minutes.
- pour le comptage de la radio-activité sur les précipités au sulfate d'ammonium, la transferrine a été marquée par addition à 2 ml de plasma de 0,7 ml de la solution radio-active diluée au 1/250°.

Ces diverses dilutions ont été calculées de manière à ce que le comptage de l'activité entre dans les limites du spectromètre.

c - Electrophorèse des protéines. Traitement des gels

Le plasma dont la transferrine a été saturée en fer radio-actif est soumis à l'électrophorèse. Le volume d'échantillon déposé est de 4 μl . Les dilutions successives permettent d'obtenir une radio-activité notable sans observer une contamination de l'ensemble du gel. Après l'électrophorèse, les gels sont sortis des tubes sous pression d'azote.

Plusieurs gels sont colorés et coupés de telle manière que les fractions protéiques séparées par la migration soient chacune dans un fragment du gel.

Les autres gels n'ayant pas subi de coloration sont coupés eux-aussi par rapport à des gels colorés de manière à isoler des fragments devant contenir chacun une fraction protéique. Le schéma de fragmentation des gels non colorés sera donné dans le chapitre "Résultats et commentaires".

Le comptage de radio-activité est fait sur chacun des fragments. Des facteurs géométriques nous ont empêché de faire des comptages de radio-activité sur les gels entiers, l'appareil utilisé ne comptant les désintégrations que sur une hauteur d'environ 2 cm.

d - Utilisation des précipités de protéines

Les protéines d'un plasma dont la transferrine a été saturée comme il a été vu précédemment, sont précipitées par des concentrations croissantes de sulfate d'ammonium. Les précipitations fractionnées sont faites pour 25, 45, 60 et 65 % de sulfate d'ammonium à saturation. Le comptage de la radio-activité est fait sur chaque précipité. Ceux-ci, sont ensuite mis en solution dans du sérum physiologique et soumis à l'électrophorèse en gel de polyacrylamide de façon à identifier les fractions protéiques qu'ils comportent.

e - Méthode de mesure de la radio-activité

Les mesures ont été faites en utilisant un spectromètre MECASERTO type Mo 13.

Les conditions de comptage ont été les suivantes :

- . seuil : 8
- . fenêtre : 50
- . gain : 30 %
- . tension d'utilisation : 1.000 volts

Il a été évidemment tenu compte dans l'expression des résultats :

- du mouvement propre de l'appareil,
- du temps de comptage

celui-ci a été déterminé pour que l'erreur soit inférieure à 5 % pour la plus forte activité trouvée.

La formule utilisée est la suivante :

$$N \pm 2 \sigma = N \pm 2 \sqrt{N + 2(M P)}$$

où : N est le nombre de coups pendant le temps t

M P, le mouvement propre de l'appareil pendant le même temps.

CHAPITRE III

RESULTATS ET COMMENTAIRES

I - DOSAGES GLOBAUX

1°) Dosage des protéines et des lipides

Les résultats des dosages des protéines et des lipides totaux du plasma de Truite arc en ciel sont donnés dans le Tableau n° I.

TABEAU n° I

VALEURS DES PROTEINES TOTALES ET DES LIPIDES TOTAUX DU PLASMA DE
LA TRUITE ARC-EN-CIEL D'ELEVAGE

- Les valeurs sont exprimées en g/l et sont suivies de l'erreur-type.

	Nombre d'animaux	Nombre de mesures	$X \pm sm$
Protéines	60	60	$37,4 \pm 0,6$
Lipides	60	30	$11,96 \pm 0,48$

Le nombre de dosages des lipides n'est que de 30 car la méthode que nous avons utilisée exige un volume d'échantillon important ; ceci nous a obligé à grouper les plasmas deux à deux.

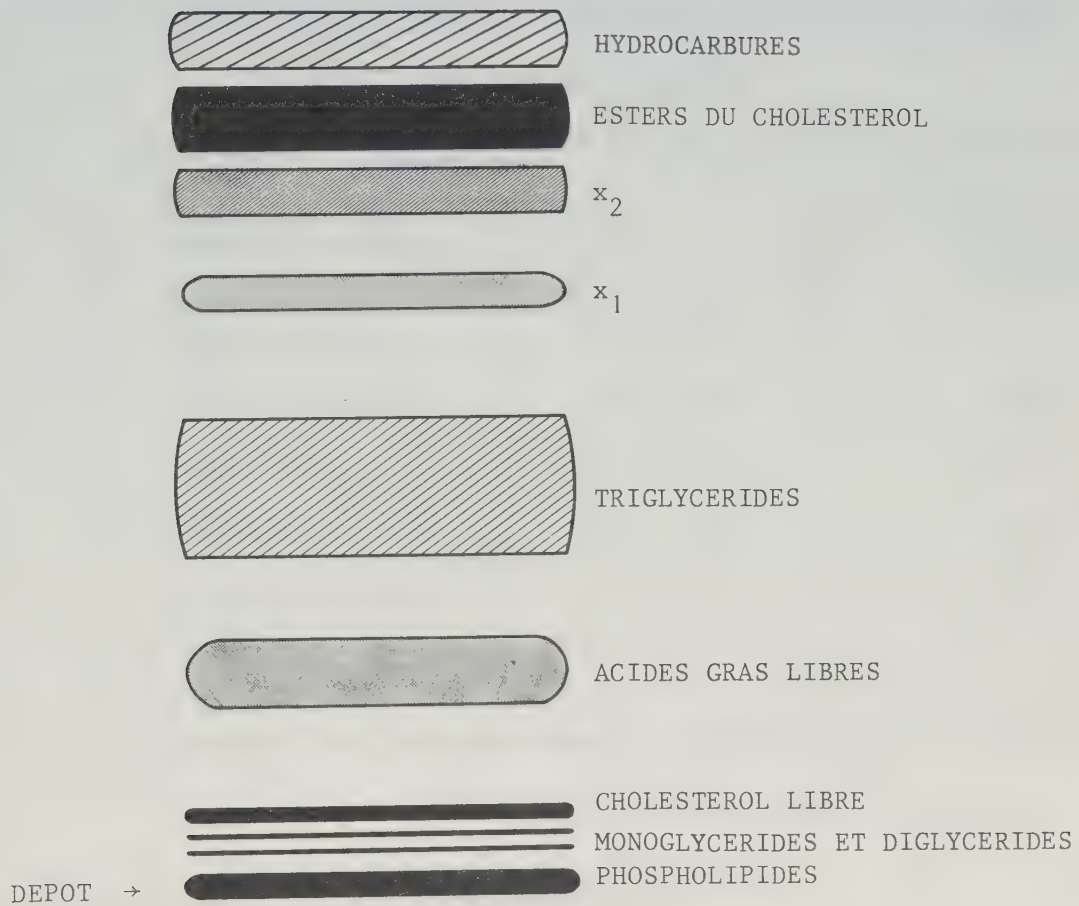
2°) Chromatographie des lipides plasmatiques totaux

La chromatographie obtenue est représentée sur la Figure n° 1. Elle correspond au schéma classique obtenu par exemple pour le plasma humain.

Il existe toutefois des fractions supplémentaires :

- 1'un migrant de la même façon qu'un témoin oléate d'éthyle, (x_1)
- 1'autre migrant comme un témoin palmitate de cétyle (x_2)

FIGURE n° 1



CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE SILICE DES LIPIDES
DU PLASMA DE TRUITE

3°) Dosage des fractions lipidiques plasmatiques

Les résultats sont rassemblés dans le Tableau n° II

TABLEAU n° II

VALEURS DES FRACTIONS LIPIDIQUES DU PLASMA DE LA TRUITE

ARC-EN-CIEL D'ELEVAGE

Les valeurs sont exprimées en g/l et sont suivies de l'erreur-type.

Nombre de mesures 15	$\bar{X} \pm sm$	Pourcentage des fractions
Lipides totaux	11,27 $\pm$ 0,72	-
Phospholipides	4,61 $\pm$ 0,29	40,9
Triglycérides	1,87 $\pm$ 0,14	16,6
Cholestérol libre	0,80 $\pm$ 0,06	7,1
Esters du cholestérol.	2,19 $\pm$ 0,15	19,4

L'ensemble des fractions dosées représente 84 % des lipides totaux.

II - ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE

Les séparations électrophorétique des protéines ont été réalisées dans des gels à 9 % et à 5,5 % de monomère. Quelques essais ont été faits en double gel 7 - 12 %.

Les résultats sont présentés sous forme de schémas, représentant les gels agrandis 2,5 fois. Nous avons respecté la largeur des bandes autant qu'il était possible de le faire. Par contre, nous n'avons pas tenu compte de l'intensité de coloration de celles-ci car la réalisation pratique s'avérait difficile.

Nous avons essayé d'effectuer des tracés au densitomètre CHROMOSCAN. Les enregistrements des profils électrophorétiques ne donnent que très imparfaitement la concentration en protéines d'une fraction séparée. Ceci semble provenir de l'épaisseur du gel et de l'impossibilité d'obtenir une ligne de base régulière.

En conséquence, nous avons dû apprécier d'une manière subjective l'intensité de coloration des bandes obtenues après coloration. Nous ne donnerons donc pas de résultats quantitatifs concernant les valeurs respectives de chaque fraction protéique.

Lorsque nous avons étudié les variations des fractions protéiques, les comparaisons n'ont été faites qu'entre fractions de même mobilité électrophorétique. Ce sont les seules qui permettent la technique de révélation par l'Amido-Schwarz. En effet, l'intensité de coloration est fonction de la structure de la protéine.

A - ASPECT GENERAL EN GEL A 9 %

1°) Les Protéines

&. Nombre de fractions :

Le diagramme électrophorétique est représenté sur la Figure n° 2. La migration a été effectuée sous deux potentiels consécutifs : 80 volts pendant 30 minutes suivie de 160 volts pendant 90 minutes.

Dans ces conditions, nous pouvons voir 13 fractions individualisées. A celles-ci, il faut ajouter trois autres bandes que nous n'avons pas obtenues pour tous les animaux. Il s'agit des fractions inconstantes, de faible intensité de coloration auxquelles nous ne nous sommes pas intéressé. Elles sont représentées en pointillé sur la Figure n° 2. Sans faire intervenir ces bandes, nous pouvons appliquer au schéma une numérotation de 1 à 13 allant des fractions de plus grande mobilité électrophorétique à celles de migration nulle.

Une migration de plus courte durée, 30 minutes à 80 volts suivie de 45 minutes à 160 volts met en évidence trois fractions de très grande mobilité électrophorétique. Ces bandes sont fines et de très faible intensité de coloration. Nous citons seulement leur présence qui semble constante mais l'étude de leur nature et de leurs propriétés n'a pas été envisagée dans ce travail.

FIGURE n° 2

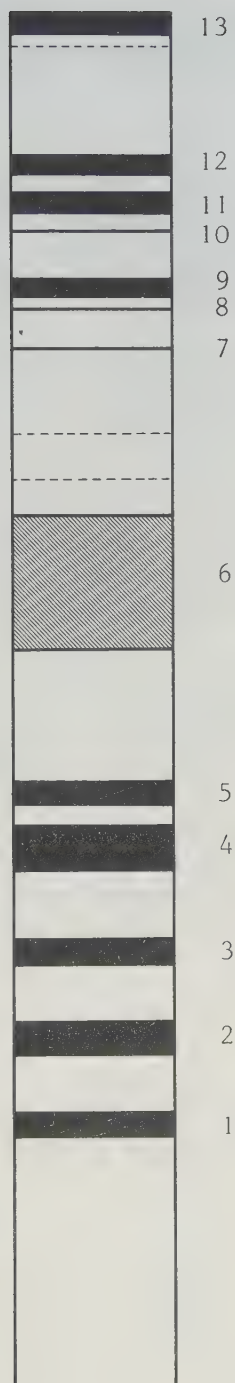


DIAGRAMME ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES PLASMATIQUES DE LA TRUITE
EN GEL DE POLYACRYLAMIDE A 9 % DE MONOMERE

& Analyse du diagramme :

Nous pouvons, arbitrairement, diviser le diagramme électrophorétique en cinq groupes selon les mobilités des fractions protéiques séparées.

- Premier groupe

Il comprend les fractions 1, 2 et 3 de mobilité électrophorétique élevée. Il s'agit d'un groupe pouvant présenter trois aspects différents. Ces trois profils possibles qui seront définitivement appelés A, B et C, sont schématisés sur la Figure n° 3.

La fréquence de leur existence est dans l'ordre A, B, C. Le profil A, le plus commun, est composé de trois fractions à peu près identiques et approximativement équidistantes.

Le profil B montre une diminution très nette de la bande 3 sans qu'il y ait d'ailleurs une augmentation correspondante des bandes 1 et 2. Les distances séparant les 3 bandes restent identiques à ce qu'elles étaient dans le profil précédemment cité.

Le profil C n'est qu'une variante du profil B où les bandes 1 et 2 sont dédoublées chacune en deux fractions identiques.

Il faut noter que lorsque les profils B et C existent, la bande 3 peut être extrêmement réduite mais elle est toujours présente sur les diagrammes électrophorétiques. De même dans ces cas, il n'existe pas de modification du reste du profil électrophorétique obtenu.

Il faut noter, pour conclure sur ce groupe, que la mobilité électrophorétique de la fraction la plus rapide est légèrement inférieure à celle de l'albumine humaine. Nous avons pu le constater en faisant des électrophorèses simultanées de plasma de Truite arc-en-ciel et de plasma humain.

- Deuxième groupe

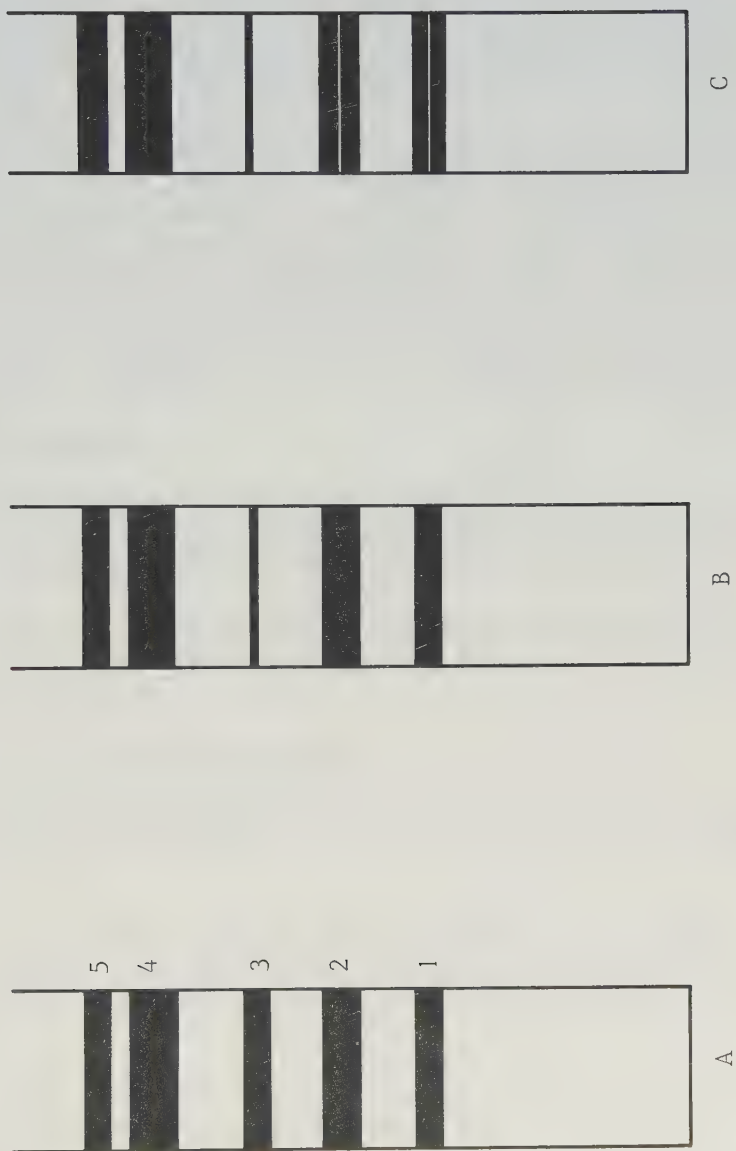
Il est composé des bandes 4 et 5 dont l'intensité de coloration est grande. Il est très constant, tant sur le plan de la largeur des bandes que sur celui de leur coloration.

- Troisième groupe

Il est représenté par la seule bande centrale 6, de coloration faible par rapport à l'ensemble des fractions. Il s'agit d'une bande diffuse dont la délimitation est malaisée. Elle s'oppose en ce sens à toutes les autres fractions séparées qui au contraire sont nettes quelle que soit leur dimension.

La largeur de la bande centrale est néanmoins constante d'un individu à l'autre. Nous avons pu constater sur certaines électrophorèses une

FIGURE n° 3



DIFFERENTS ASPECTS DES FRACTIONS DE GRANDE MOBILITE ELECTROPHORETIQUE

amplification de la coloration vers la partie supérieure de la bande 6 mais sans toutefois pouvoir la dissocier en plusieurs parties.

- Quatrième groupe

Ce sont les fractions de faible mobilité électrophorétique. Il s'agit d'un groupe assez hétérogène dont les diverses fractions (7 à 12) sont de largeur et d'intensité de coloration très inégales. Les bandes 11 et 12 sont toujours individualisées et fortement colorées. Leur aspect est identique dans tous les diagrammes électrophorétiques.

Par contre, l'aspect des bandes 7, 8, 9 et 10 est variable d'un animal à l'autre, non sur le plan des mobilités mais sur celui des intensités de coloration. La bande 9 est dans la plupart des cas prédominante. Ces divers aspects peuvent faire penser, au premier abord, qu'il s'agit de profils électrophorétiques différents mais l'étude des mobilités électrophorétiques montre qu'il n'en est rien. De plus, des bandes insconstantes peuvent apparaître à proximité de la bande centrale 6, augmentant ainsi la disparité de ce groupe de fractions.

- Cinquième groupe

Il est composé des fractions de mobilité électrophorétique nulle, c'est-à-dire, des molécules protéiques se rassemblant à l'interface gel de rassemblement-gel de séparation (bande 13).

Ce groupe peut être scindé en plusieurs fractions dans un gel de moindre concentration en monomère, comme nous l'avons réalisé dans les gels à 5,5 %.

&. Etude d'un tracé densitométrique

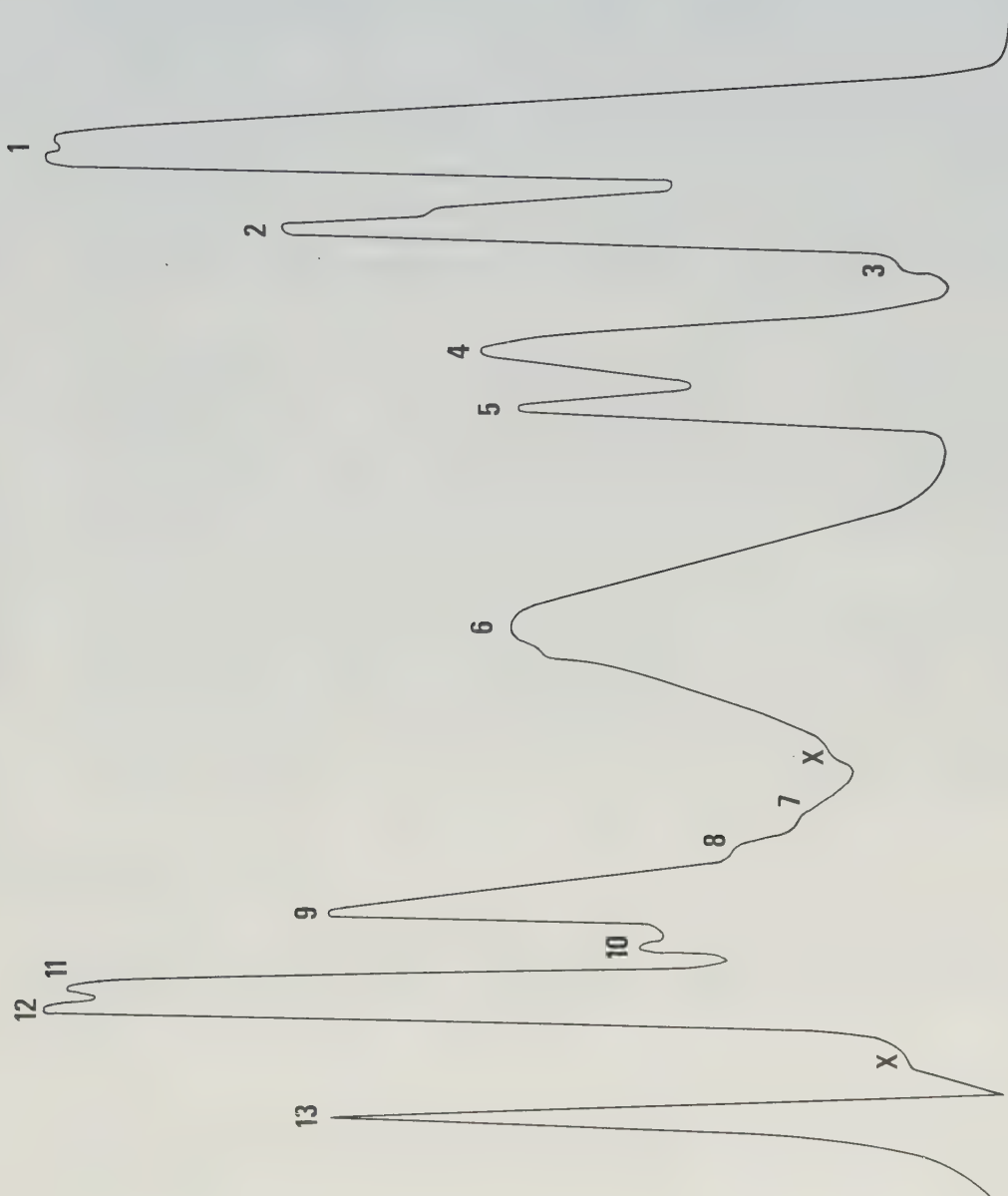
Le tracé densitométrique que nous présentons Figure n° 4 avec les réserves données précédemment, est celui d'un profil électrophorétique de type C.

En effet, les bandes 1 et 2 sont dédoublées et la bande 3 est extrêmement réduite. Les 13 fractions sont chacune, traduites par un pic dont la surface doit être théoriquement proportionnelle à la coloration.

Il faut noter qu'outre les 13 fractions constantes, nous voyons sur ce tracé densitométrique la présence de deux fractions inconstantes marquées x.

L'illustration de la déficience d'un tel tracé pour une étude quantitative est donnée par la bande 13. L'importance de cette fraction est en réalité beaucoup plus grande que celle qu'elle a sur le graphique. Ceci est probablement dû à la différence des indices de réfraction existant entre le gel de rassemblement et le gel de séparation, ces gels n'ayant pas la même concentration en monomère.

FIGURE n° 4



TRACE DENSITOMETRIQUE A L'APPAREIL CHROMOSCAN D'UN PROFIL

ELECTROPHORETIQUE DE TYPE C.

&. Etude des variations

L'impossibilité de déduire des résultats quantitatifs des tracés densitométriques nous a limité dans l'étude des variations des fractions protéiques. Nous n'avons pu apprécier que d'une manière subjective l'intensité de coloration des bandes.

Nous avons déjà cité des variations individuelles relatives au quatrième groupe des fractions et celles concernant les trois aspects possibles A, B et C des fractions les plus mobiles. Nous n'avons pas pu déterminer l'origine de ces variations, bien que notre étude ait porté sur 400 animaux environ, ceci sur une période approximative de 18 mois. Ces variations n'existent pas seulement d'un lot d'animaux à l'autre, mais à l'intérieur d'un même lot de truites.

Nous n'avons pas noté, non plus, sur toute la période de notre expérimentation de variations saisonnières. Le sexe des truites a été déterminé par examen des gonades dans le but de distinguer une fraction protéique caractéristique du sexe des animaux. Les diagrammes électrophorétiques n'ont pas révélé l'existence d'une telle fraction et nous n'avons pas noté non plus de variations dans l'intensité de coloration de certaines bandes.

Pour certaines expériences, nous avons effectué le dosage des protéines plasmatiques et noté la valeur de la protéinémie. Dans le cas de valeur faible de celle-ci, nous avons remarqué une diminution de l'intensité de coloration proportionnelle pour toutes les fractions, sans disparition d'aucune. Ceci montre donc que la diminution de la protéinémie est le résultat d'une simple hémodylution, comme le montrent les valeurs de l'hématocrite.

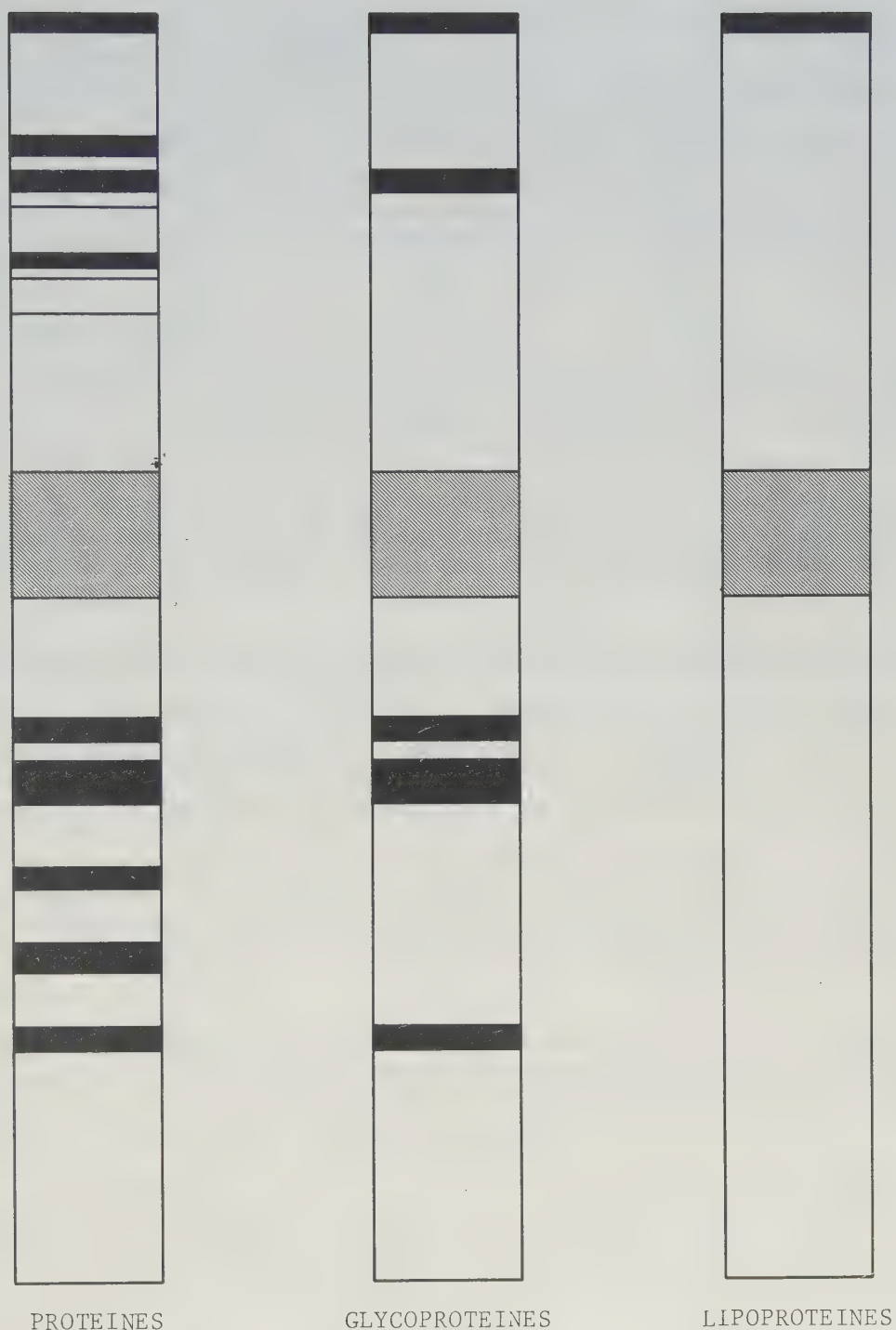
2°) Les glycoprotéines

La révélation des glycoprotéines par le réactif de Schiff permet de mettre en évidence 6 fractions de nature glycoprotéique comme il est montré sur la Figure n° 5, ceci pour un dépôt de 20 μ l à l'électrophorèse.

En effet, pour des volumes d'échantillons plus importants nous pouvons observer un nombre supérieur de fractions glycoprotéiques. Toutefois, dans ces conditions, la diffusion déjà importante pour un dépôt de 20 μ l, ne permet pas une bonne individualisation des bandes.

De nombreuses fractions semblent contenir en fait une copule glucidique (bandes 2 et 3), mais nous nous sommes limités à celles présentant nettement le caractère glycoprotéique. Les 6 fractions de cette nature sont les bandes 1, 4 et 5, la bande centrale 6 et les bandes 11 et 13.

FIGURE n° 5



PROTEINOGRAMME, GLUCIDOGRAMME ET LIPIDOGRAMME
DES FRACTIONS PLASMATIQUES DE LA TRUITE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE
A 9 % DE MONOMERE

Il faut noter la nature glycoprotéique de la bande ne migrant pas dans les conditions opératoires.

Les fractions 2 et 3 ont un caractère glycoprotéique moins marqué que les autres fractions, la réaction est très faible.

Dans le cas d'un profil C, c'est-à-dire dédoublement des fractions 1 et 2, avec grande diminution de la fraction 3, la coloration des glycoprotéines s'étend sur toute la largeur des bandes 1 et 2, ce qui montre que les deux unités composant la bande sont de nature glycoprotéique.

3°) Les lipoprotéines

La coloration des lipoprotéines met en évidence deux fractions ayant ce caractère. Il s'agit de la bande centrale 6 et de la fraction de mobilité nulle dans le gel à 9 % d'acrylamide.

Ce résultat est schématisé sur la Figure n° 5. La bande centrale 6 est mal délimitée et il se produit un phénomène de traînée prenant la coloration au Noir Soudan ; ceci est dû à l'important volume de l'échantillon déposé (20 µl).

4°) Electrophorèse des protéines plasmatiques d'autres espèces de Poissons

Cette étude annexe a eu pour but de déterminer des points communs existant entre les protéines plasmatiques de la Truite arc-en-ciel d'élevage et celles de diverses espèces appartenant à des familles de Poissons plus ou moins éloignées dans la classification zoologique.

Les Poissons utilisés ayant eu des provenances diverses, nous présentons Figure n° 6 des schémas des profils électrophorétiques qui ne sont que des exemples. Ils n'ont qu'une valeur indicative d'autant plus que notre étude n'a porté que sur un nombre restreint d'animaux de chaque espèce.

L'analyse des diagrammes électrophorétiques des protéines plasmatiques a montré la totale originalité des protéines d'une espèce à l'autre. On voit que les profils électrophorétiques de deux Percidés, la Perche-Soleil et la Perche par exemple sont assez différents.

Il en est de même pour les protéines plasmatiques de deux Cyprinidés, la Carpe et la Tanche. Par contre, deux fractions sont constantes chez toutes les espèces étudiées. Il s'agit de la fraction de mobilité nulle et de la fraction centrale que nous avons notée 6 chez la Truite arc-en-ciel.

Cette fraction centrale a des mobilités variables selon les espèces mais se trouve toujours au milieu du profil électrophorétique. Cependant,

FIGURE n° 6



PROFILS ELECTROPHORETIQUES DES PROTEINES PLASMATIQUES
DES DIVERSES ESPECES DE POISSONS ETUDIEES EN GEL DE POLYACRYLAMIDE
A 9 % DE MONOMERE

nous avons pu noter, chez le Brochet par exemple, des fractions individualisées se trouvant principalement au début de la bande large.

Comme chez la Truite arc-en-ciel, la fraction centrale et celle de mobilité nulle sont de nature glycolipoprotéique pour toutes les espèces que nous avons étudiées.

B - ASPECT GENERAL EN GEL A 5,5 %

L'électrophorèse en gel à 5,5 % a permis le fractionnement de la bande ayant une mobilité nulle en gel à 9 % de monomère.

La largeur des fractions séparées étant grande, nous avons dû doubler le volume des échantillons déposés par rapport à ceux des électrophorèses en gel à 9 %.

Dans ces conditions, la fraction de mobilité nulle est scindée en trois bandes dont deux pénètrent le gel de séparation. De ces deux fractions, l'une, la plus mobile est de nature lipoprotéique, l'autre de nature glyco-lipoprotéique. La fraction qui conserve une mobilité électrophorétique nulle donne une réaction avec les colorants des lipides et des glucides. Cependant, elle ne donne pas la coloration des protéines. La partie protéique de ces molécules semble donc être en proportion très faible par rapport aux parties lipidiques et glucidiques.

C - ELECTROPHORESE EN DOUBLE GEL

Ce type de gel (7 - 12 %) n'apporte pas d'éléments nouveaux dans le fractionnement des protéines plasmatiques de la Truite arc-en-ciel par rapport aux techniques en gel à 5,5 et 9 % de monomère. Il permet seulement d'obtenir sur un même gel un profil électrophorétique plus complet. Ce profil comporte toutes les bandes obtenues en gel à 9 % plus celles provenant de la fraction de migration nulle. Cette technique présente surtout l'intérêt de réunir sur un même gel toutes les fractions de nature lipoprotéique.

D - ELECTROPHORESE EN GRADIENT DE CONCENTRATION D'ACRYLAMIDE

Nous avons effectué quatre séries d'électrophorèses de ce type. Les profils électrophorétiques sont d'un aspect entièrement différent de celui obtenu avec la technique disc-electrophoresis. Ce nouvel aspect est dû essentiellement au fait que les composés protéiques migrent à travers les mailles, de plus en plus étroites du gel

d'acrylamide. Elles sont arrêtées lorsque leur encombrement stérique ne permet plus ce passage. Il se produit un tassement des fractions et si nous notons l'apparition de nouvelles bandes à proximité du dépôt de l'échantillon, le résultat est inverse pour les fractions de plus grande mobilité.

Nous ne constatons aucune modification concernant la bande centrale 6 des gels à 9 % : elle se présente encore comme une tache homogène. Les bandes 1, 2 et 3 obtenues dans les gels à 9 % forment une bande très large, où elles peuvent être difficilement distinguées les unes des autres. Leur distance de migration est également dans cette technique, légèrement inférieure à celle de la fraction albuminique humaine.

III - CHROMATOGRAPHIE SUR GEL DE DEXTRAN

1°) Variations expérimentales

Nous avons utilisé successivement des colonnes de 50 cm, 100 et 180 cm pour améliorer la séparation. Nous avons constaté une meilleure séparation pour la colonne de plus grande dimension. Dans ce cas, les pics sont mieux individualisés, la ligne de base séparant deux pics est la plus basse possible. De même, nous avons déposé des volumes variables d'échantillons. Un dépôt de 4 ml sur la colonne mesurant 50 cm donne une plus mauvaise séparation qu'un dépôt de 2 ml sur cette même colonne. Nous avons choisi finalement la colonne de 180 cm sur laquelle nous avons fait des essais concernant les dépôts d'échantillons de plasma concentré au 1/2 par ultra-filtration. Aucune amélioration notable n'a été remarquée dans ces conditions.

2°) Diagramme d'élution

Un exemple de diagramme obtenu par chromatographie est présenté sur la Figure n° 7.

Il correspond à une chromatographie effectuée sur 5 ml de plasma, dans une colonne de 180 cm de Sephadex G 200. Le débit était de 8 ml par heure.

Nous avons exprimé la densité optique de chacun des tubes contenant 4 ml d'éluant, mesurée à 280 nm. Le diagramme montre que dans ces conditions l'élution totale est réalisée pour 390 ml d'éluant environ.

Il se compose de trois pics séparés entre eux par 7 à 10 tubes soit une trentaine de ml d'éluant.

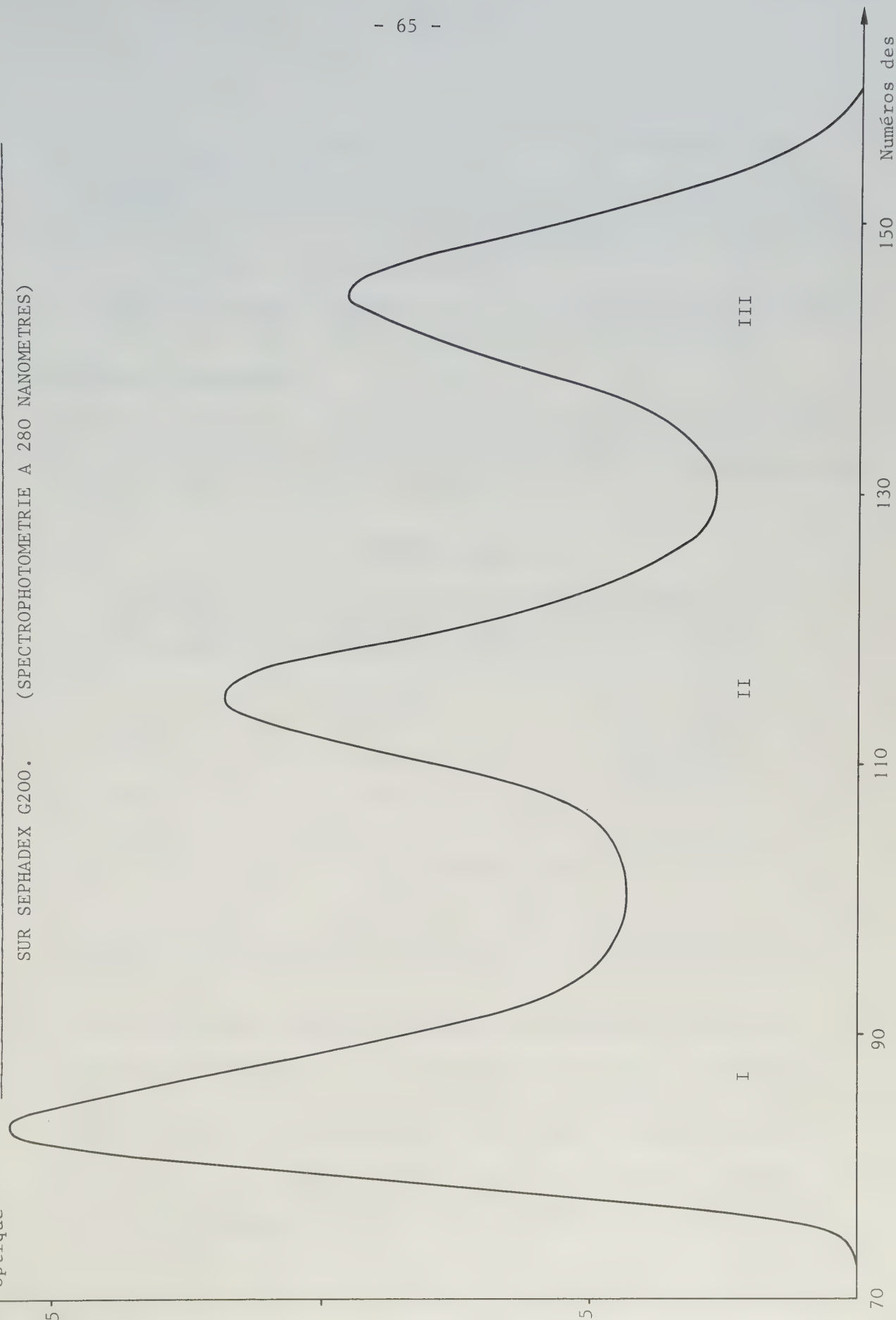
Densité
optique

FIGURE n° 7

COURBE D'ELUTION DES PROTEINES PLASMATIQUES DE LA TRUITE OBTENUE PAR CHROMATOGRAPHIE

SUR SEPHADEX G200.

(SPECTROPHOTOMETRIE A 280 NANOMETRES)



Il faut noter que la séparation des pics I et II est meilleure que celle des pics II et III.

Un quatrième pic dont l'élution commence pour 700 ml d'éluant environ était présent dans toutes les chromatographies que nous avons effectuées. Cependant, pour ce pic, les réactions d'identification des acides aminés et des protéines se sont avérées négatives.

La nature des composés contenus dans ce pic d'élution dont l'importance quantitative est assez faible, n'a pas retenu notre attention.

3°) Résultats quantitatifs

Nous avons calculé la surface de chacun des pics, ceci pour une série de dix chromatographies effectuées avec une colonne de 180 cm.

Les pourcentages de ceux-ci par rapport à la surface du diagramme total d'élution sont donnés dans le Tableau n° III.

TABLEAU n° III

IMPORTANCE RELATIVE DE CHAQUE PIC EXPRIMEE EN POURCENTAGE
DE LA SURFACE DU DIAGRAMME D'ELUTION ET VALEURS LIMITES

	Pourcentage	Valeurs limites
Pic I	34,8 %	27,4 - 44,8 %
Pic II	35,5 %	25,1 - 42,0 %
Pic III	29,7 %	27,4 - 32,0 %

Il faut remarquer que le pic III a une surface constante pour tous les essais. Il n'en est pas de même pour les pics I et II qui semblent assez variables.

4°) Electrophorèse des fractions correspondant aux pics I, II et III

Nous avons effectué des électrophorèses sur les éluats correspondant à chacun des pics obtenu par chromatographie. Les volumes d'éluant de chaque groupe ont été réunis et concentrés par ultra-filtration. Nous n'avons sélectionné que les tubes correspondant aux sommets des pics.

Les diagrammes électrophorétiques obtenus en gel à 9 % de monomère sont schématisés sur la Figure n° 8. Nous allons analyser successivement ces diagrammes.

FIGURE n° 8



ELECTROPHORESE DES FRACTIONS PROTEIQUES PRESENTES DANS LA
PARTIE MEDIANE DES PICS D'ELUTION DE LA CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G200

Pic I : il est constitué par les fractions de mobilité électrophorétique nulle ou faible (fractions 11, 12 et 13)
Ces trois fractions sont retrouvées en totalité.

Pic II : il renferme les fractions de mobilité électrophorétique moyenne, c'est-à-dire celle migrant moins loin que la bande centrale 6 (fractions 7, 8, 9, 10). Les fractions inconstantes lorsqu'elles existent sont retrouvées dans ce pic de chromatographie.

Pic III : il met en évidence les fractions de mobilité électrophorétique les plus élevées (fractions 1, 2, 3, 4, 5)
Dans ce pic, nous retrouvons les 3 profils précédemment cités A, B et C et décrits sur la Figure n° 3.

Les diagrammes électrophorétiques des éluats de la chromatographie ne permettent pas de retrouver la bande centrale 6. Celle-ci semble être dissociée bien que dans certaines expériences nous l'ayons retrouvée très diminuée en largeur et en intensité de coloration.
Lorsqu'elle est dissociée, elle se présente sous forme de bandes individualisées que l'on retrouve dans le deuxième pic d'élution.

Nous avons dû procéder parfois d'une manière différente. Nous avons réuni les éluats de chromatographie tous les dix tubes, ce qui donne des fractions de 40 ml. Cette méthode permet de séparer approximativement les parties ascendantes et les parties descendantes des pics d'élution et les parties situées entre ces pics. Les électrophorèses des éluats concentrés n'ont pas été représentées schématiquement.

Dans le pic I, les électrophorèses montrent que les fractions électrophorétiques 11 et 13 sont éluées les premières, suivies de la fraction 12, correspondant à la branche descendante du pic.

Dans le pic II, les fractions sont éluées dans l'ordre 7, 8 d'abord puis, 9 et 10. En fait, il y a prédominance d'un groupe de fractions par rapport à l'autre et non une séparation absolue.

Par contre, dans le pic III, les cinq fractions les plus mobiles à l'électrophorèse sont éluées en même temps, sans prédominance nette de l'une par rapport aux autres. Les éluats séparant deux pics renferment un mélange des protéines de ces deux pics, à faible concentration. Dans cette technique également, la bande 6 est dissociée.

IV - PRECIPITATIONS PAR LE SULFATE D'AMMONIUM

Nous envisagerons d'abord les résultats obtenus par traitement du plasma total par diverses concentrations de sulfate d'ammonium puis ceux donnés par précipitations fractionnées sur un même échantillon.

1°) Traitement d'un plasma total

Chaque précipité est remis en solution dans un volume de sérum physiologique identique à celui du plasma initial.

Des électrophorèses ont été réalisées en gel à 9 % de monomère dans les conditions de migration décrites précédemment pour le plasma. Les précipitations ont été effectuées aux concentrations suivantes : 25 - 40 - 45 - 50 - 55 - 60 et 65 % de sulfate d'ammonium à saturation.

Nous ne présentons pas de schéma montrant les diagrammes électrophorétiques obtenus. En effet, pour chacune des concentrations en sulfate d'ammonium utilisée, les fractions protéiques ne précipitent pas en totalité sauf à la concentration de 25 % où la bande 2 est isolée totalement.

De plus, nous notons l'apparition de nouvelles bandes à l'électrophorèse. Ceci est dû certainement à des modifications structurales des protéines sous l'influence du sulfate d'ammonium.

La bande 6 n'est jamais retrouvée, pour aucune des concentrations utilisées. Il en est de même pour la fraction 8. Des dosages effectués sur des précipités ont montré que la presque totalité des protéines plasmatiques était précipitée pour une concentration de 65 % de sulfate d'ammonium à saturation.

Cette technique d'étude de la solubilité des protéines nous a servi essentiellement à déterminer les concentrations en sulfate d'ammonium qui donnent les précipitations fractionnées les plus sélectives.

2°) Précipitations fractionnées

Les concentrations en sulfate d'ammonium saturé, choisies sont de 25 - 45 - 60 et 65 %.

Ces quatre concentrations permettent une précipitation sélective appréciable. Nous avons représenté les diagrammes électrophorétiques des protéines de chaque précipité et celui du plasma total sur la Figure n° 9.

Sur ce schéma, les fractions non totalement précipitées ont été représentées par des hachures espacées.

Pour une concentration de 25 % de sulfate d'ammonium à saturation, la bande 12 est précipitée en totalité. Aucune autre fraction pro-

FIGURE n° 9



ELECTROPHORESE EN GEL DE POLYACRYLAMIDE DES PROTEINES
DU PLASMA DE TRUITE PRECIPITEES A DES CONCENTRATIONS CROISSANTES
DE SULFATE D'AMMONIUM (CONCENTRATIONS EXPRIMEES EN % DE SATURATION).

téique n'est apparente sur le reste du gel.

Pour la concentration de 45 %, le précipité est constitué essentiellement des fractions de mobilité électrophorétique nulle - fraction 13 - et moyenne - 7, 8, 9, 10, 11.

Nous pouvons noter dans ce même précipité l'apparition des bandes 4 et 5. Leur importance quantitative est assez minime ; nous les avons néanmoins mentionnées sur le schéma.

Il en est de même pour les précipitations suivantes. Pour 60 % de sulfate d'ammonium à saturation, les fractions 4 et 5 précipitent totalement mais nous remarquons déjà la présence des bandes 2 et 3. Les bandes 7 et 8 qui précipitent à 45 % sont encore présentes à de très faibles concentrations.

Pour 65 % de sulfate d'ammonium à saturation, les bandes 1, 2 et 3 sont précipitées en totalité. Nous avons représenté les traces des fractions 4 et 5 qui restent encore présentes pour cette concentration.

L'existence dans un précipité de fractions protéiques devant être normalement isolées à des concentrations plus élevées de sulfate d'ammonium peut avoir deux causes : les fractions peuvent être partiellement précipitables à cette concentration ou y être présentes à cause d'un lavage insuffisant du précipité. Le premier point sera envisagé dans le chapitre suivant. Le deuxième résulte d'une constatation expérimentale concernant la solubilité des protéines. En effet, chaque précipité n'a pu être lavé qu'une seule fois dans le sulfate d'ammonium correspondant car la multiplicité des lavages entraîne des modifications irréversibles dans la solubilité des protéines. Le précipité prend alors un aspect différent et sa solubilisation dans le sérum physiologique est difficile.

Nous n'avons pas retrouvé dans cette technique de précipitation la fraction 6. Il semble qu'elle soit dénaturée comme elle l'est lors de la séparation chromatographique sur gel de dextran.

V - CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES

1°) Conservation des plasmas

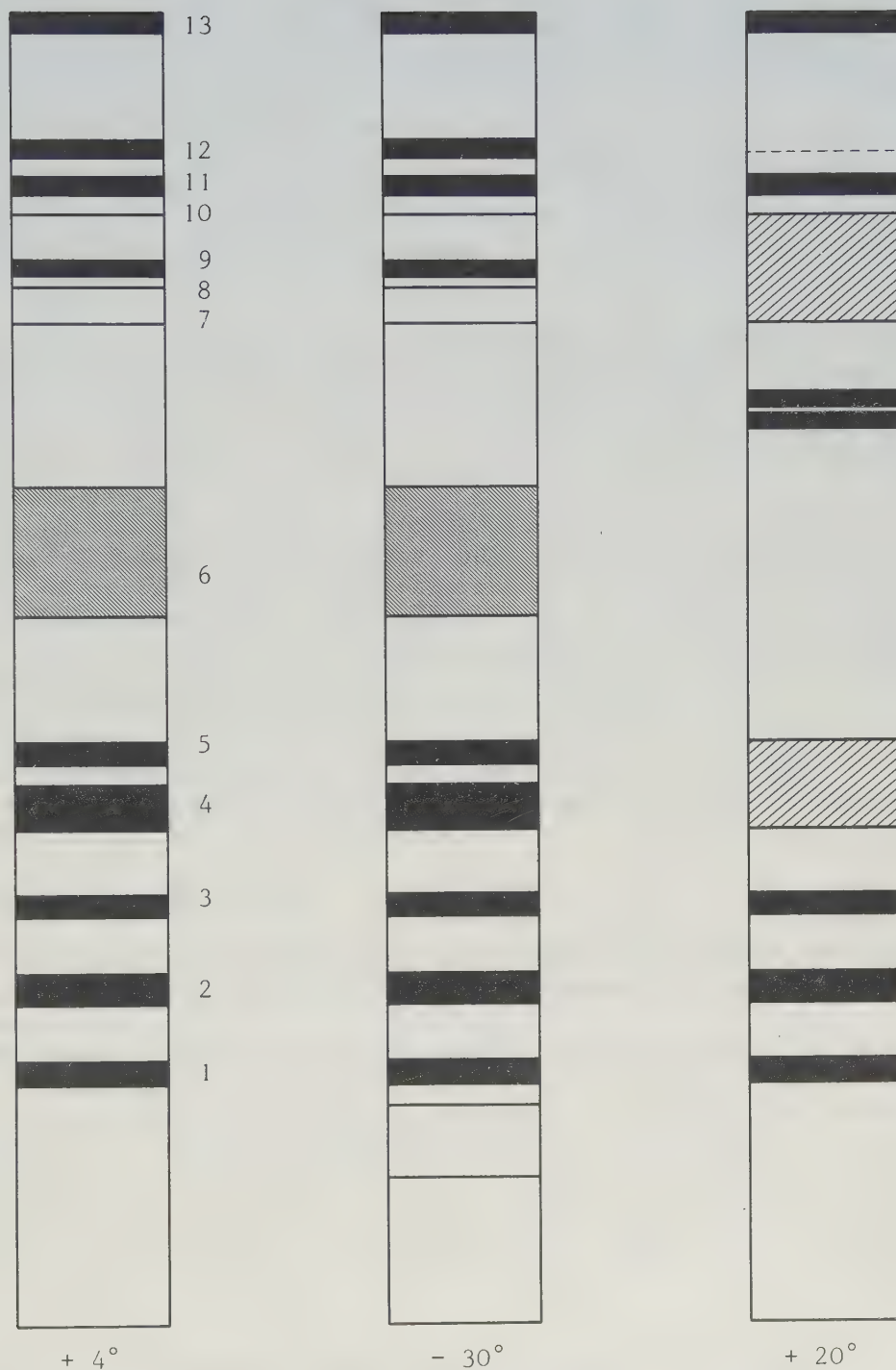
Trois échantillons d'un même plasma ont été conservés pendant 4 jours simultanément dans un réfrigérateur, dans un congélateur et à la température du laboratoire (20°-24°).

Des électrophorèses ont été ensuite réalisées (dépôt 3 µl)

Les résultats obtenus sont schématisés sur la Figure n° 10.

Aucune modification n'est appréciable pour le plasma conservé au réfrigérateur.

FIGURE n° 10



MODIFICATIONS DU PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES EN FONCTION
DU MODE DE CONSERVATION DU PLASMA

Les fractions sont retrouvées dans leur intégralité, sans modification de leur mobilité électrophorétique. Pour cette raison, nous n'avons pas représenté le diagramme électrophorétique d'un plasma frais : le diagramme du plasma conservé à + 4° servira de témoin pour apprécier les modifications survenues aux deux autres.

Le profil électrophorétique du plasma congelé n'a que très peu varié. Les seules modifications visibles sont l'apparition en avant de la fraction 1 de deux fractions de largeur relativement faible. Ces deux bandes sont sans grande importance du point de vue quantitatif mais méritent quand même d'être signalées.

Par contre, la conservation d'un plasma à la température ambiante, entraîne des modifications nettes dans les profils électrophorétiques. Ceci se traduit par l'apparition de nouvelles fractions protéiques tandis que d'autres se trouvent supprimées totalement ou partiellement. Les fractions 1, 2 et 3 sont conservées identiques à ce qu'elles sont dans un plasma frais.

Les fractions 4 et 5 ne sont plus distinctes l'une de l'autre, un ensemble de bandes plus ou moins individualisées occupent leur place.

Ces nouvelles fractions ont été représentées par des hachures espacées car nous étions dans l'impossibilité de les tracer une par une.

Il en est de même pour la bande remplaçant les fractions 7, 8, 9 et 10. Deux bandes apparaissent sur le gel. Leur importance est assez grande. Leurs intensités de coloration sont identiques.

La bande centrale 6 est absente en totalité. Par contre, la fraction 12 bien que très réduite est quand même visible sur le gel.

Aucune modification sensible n'est à remarquer pour les fractions de mobilité électrophorétique nulle.

2°) Résistance à la chaleur

Le traitement d'un plasma par la chaleur, bain-marie à 55° dans notre expérimentation, peut provoquer la dénaturation des fractions protéiques.

Pour mieux juger de la thermostabilité d'une fraction, nous avons choisi deux durées d'exposition à la chaleur : 30 et 120 minutes.

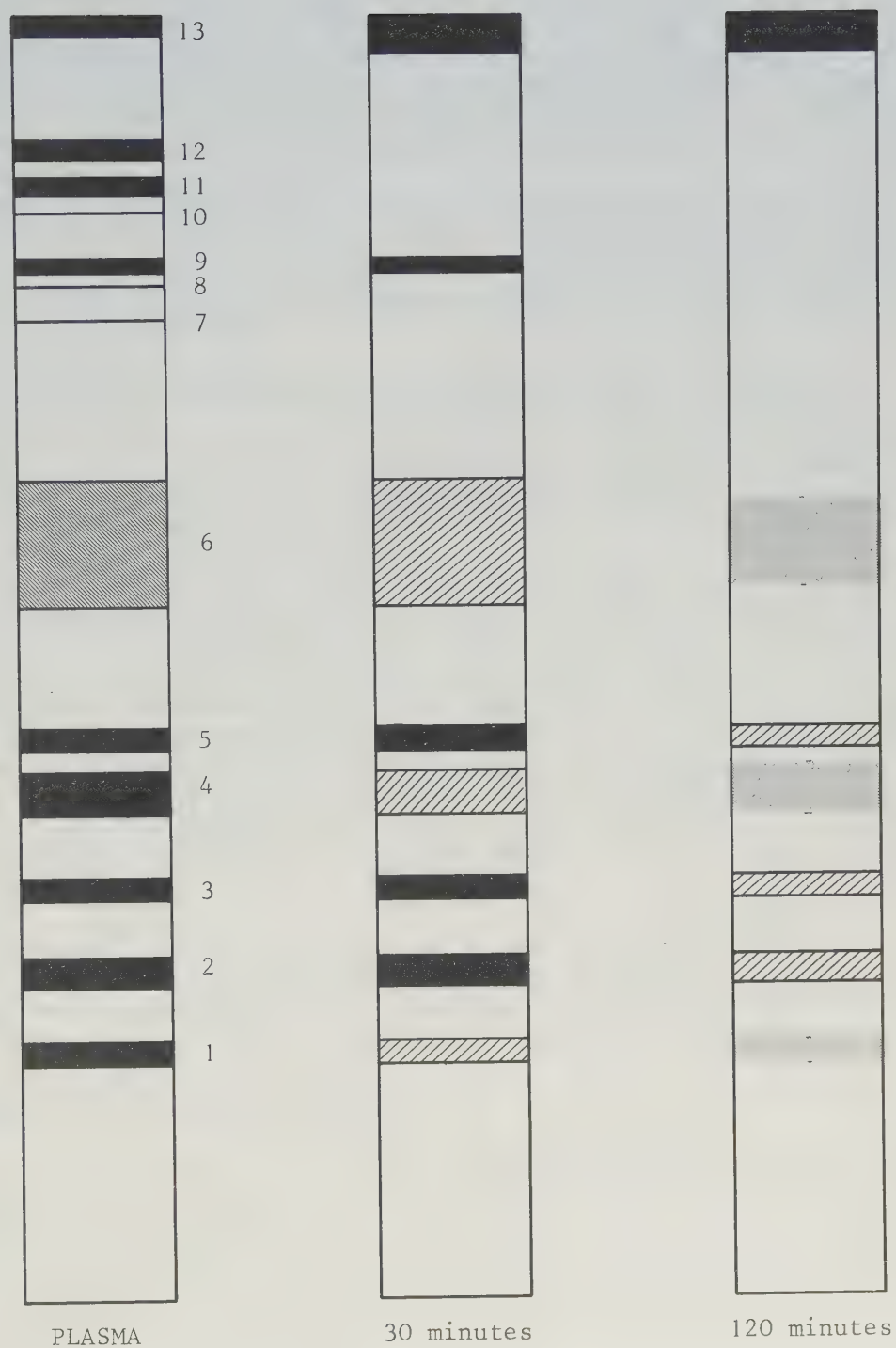
Nous avons apprécié trois caractères : thermostabilité totale, thermostabilité partielle, thermolabilité selon l'intensité de coloration de chacune des fractions séparées. Les protéines dénaturées sont retrouvées soit dans le gel échantillon soit dans le gel de séparation sous l'aspect de nouvelles bandes ; pour celles-ci, la dénaturation ne se traduit que par une modification de leur mobilité électrophorétique.

- Profil électrophorétique après traitement de 30 minutes

Celui-ci est représenté sur la Figure n° 11.

Nous n'avons pas mentionné les nouvelles bandes, leur tracé aurait diminué la clarté du schéma sans apporter pour autant de données intéressantes.

FIGURE n° 11



MODIFICATIONS DU PROFIL ELECTROPHORETIQUE DES PROTEINES

APRES TRAITEMENT PAR LA CHALEUR A 55° PENDANT 30 MINUTES ET 120 MINUTES

Le premier groupe de fractions, c'est-à-dire les fractions 1, 2 et 3 ne semble pas être modifié sauf en ce qui concerne la fraction 1a plus mobile, qui paraît moins colorée après traitement par la chaleur. De même, la fraction 4 est fortement diminuée, la fraction 5, voisine, étant conservée intacte. La bande centrale 6, est réduite dans sa largeur et présente une intensité de coloration beaucoup plus faible.

Dans le quatrième groupe de mobilité électrophorétique, seule la fraction 9 est conservée ; toutes les autres ont disparu du gel.

La fraction 13 est plus importante quantitativement. Sa largeur montre cependant que des protéines ont pénétré sur une faible distance, le gel de séparation.

- Profil électrophorétique après traitement de 120 minutes

Dans le premier groupe de fractions, la bande 1 est totalement dénaturée et ne figure plus sur le gel de séparation. La fraction 2 semble peu modifiée dans son intensité de coloration. Par contre, la fraction 3 est nettement moins colorée qu'après 30 minutes de traitement par la chaleur.

Les fractions 4 et 5 sont très diminuées par rapport à ce qu'elles étaient dans l'expérience précédente. La bande centrale, fraction 6, ne se présente plus que sous l'aspect d'une tâche très indéterminée dans ces limites. Sa coloration est très faible.

La partie supérieure du gel de séparation ne comporte plus aucune fraction distincte. Seules sont présentes des bandes très fines, très peu colorées mais néanmoins décelables. Ces bandes ne se situent pas à l'emplacement des fractions que nous avons définies et numérotées. Il s'agit de protéines dénaturées, dont la mobilité électrophorétique a changé. La fraction de mobilité nulle a le même aspect que précédemment.

En résumé, nous pouvons donc dire que toutes les fractions subissent des modifications après deux heures de traitement par la chaleur.

Seules les fractions 2 et 5 semblent être les moins sensibles à cette dénaturation thermique, avec à un degré moindre les fractions 3 et 4.

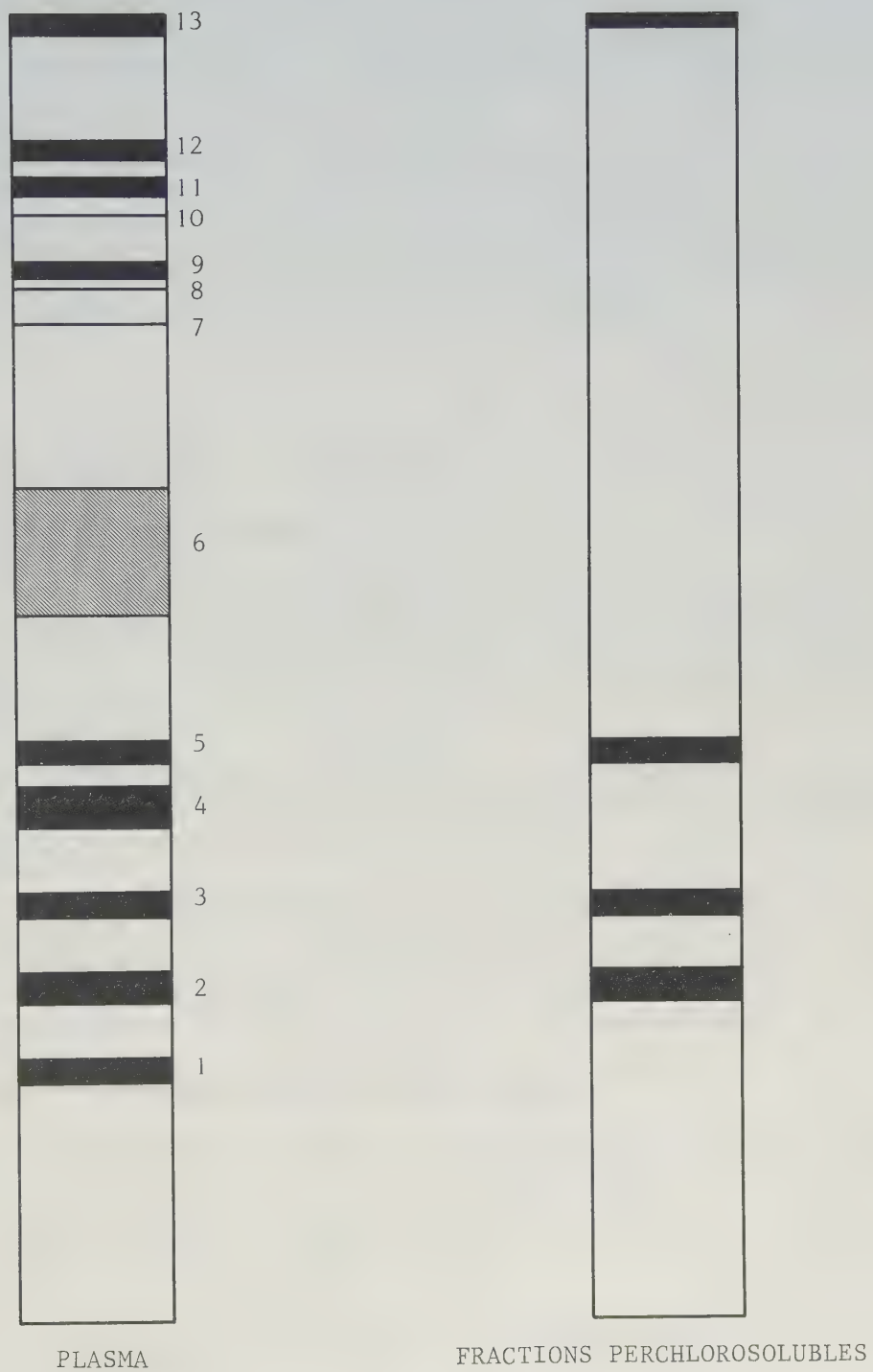
3°) Solubilité dans l'acide perchlorique

L'étude de la solubilité des protéines de la Truite arc-en-ciel dans l'acide perchlorique 0,2 N met en évidence 3 fractions protéiques possédant cette propriété.

Comme pour l'étude précédente, nous pouvons distinguer le caractère solubilité partielle du caractère solubilité totale par l'intensité de coloration des bandes, autant qu'il est possible de le faire par évaluation subjective.

Le schéma obtenu est représenté sur la Figure n° 12.

FIGURE n° 12



FRACTIONS PROTEIQUES SOLUBLES DANS L'ACIDE PERCHLORIQUE 0,2 N

Après traitement par l'acide perchlorique 0,2 N, trois fractions sont présentes dans le gel. Il s'agit des fractions 2, 3 et 5, c'est-à-dire les fractions de grande mobilité électrophorétique. Nous pouvons en outre les classer selon l'importance de leur solubilité. La fraction 2 est perchlorosoluble pratiquement en sa totalité, les fractions 3 et 5 l'étant à un degré moindre, et dans cet ordre.

Sur le reste du gel de séparation, nous ne pouvons distinguer aucune fraction. Seule la bande correspondant aux fractions de mobilité électrophorétique nulle prend légèrement la coloration à l'Amido-Schwarz, mais il peut s'agir de protéines dénaturées n'ayant pas été totalement éliminées du milieu par la centrifugation après traitement par l'acide perchlorique.

VI - ETUDE DU FIBRINOGENE

1°) Etude électrophorétique

L'identification du fibrinogène a été effectuée en comparant les profils électrophorétiques du plasma et du sérum d'un même animal. Ces études ont été réalisées en gel à 9 % et en gel à 5,5 % d'acrylamide. Les résultats pour le gel à 9 % sont schématisés sur la Figure n° 13.

Ils montrent que le fibrinogène constitue la fraction 12 du diagramme électrophorétique des protéines plasmatiques. En effet, cette fraction est présente dans le plasma et absente dans le sérum.

Nous avons pu remarquer des variations quantitatives de cette fraction et même son absence totale dans le plasma.

Ceci peut se produire chez les animaux maintenus plus de trois semaines au Laboratoire. Nous avons signalé ce fait dans le chapitre traitant du matériel et des techniques utilisés.

2°) Etude de la composition en acides aminés

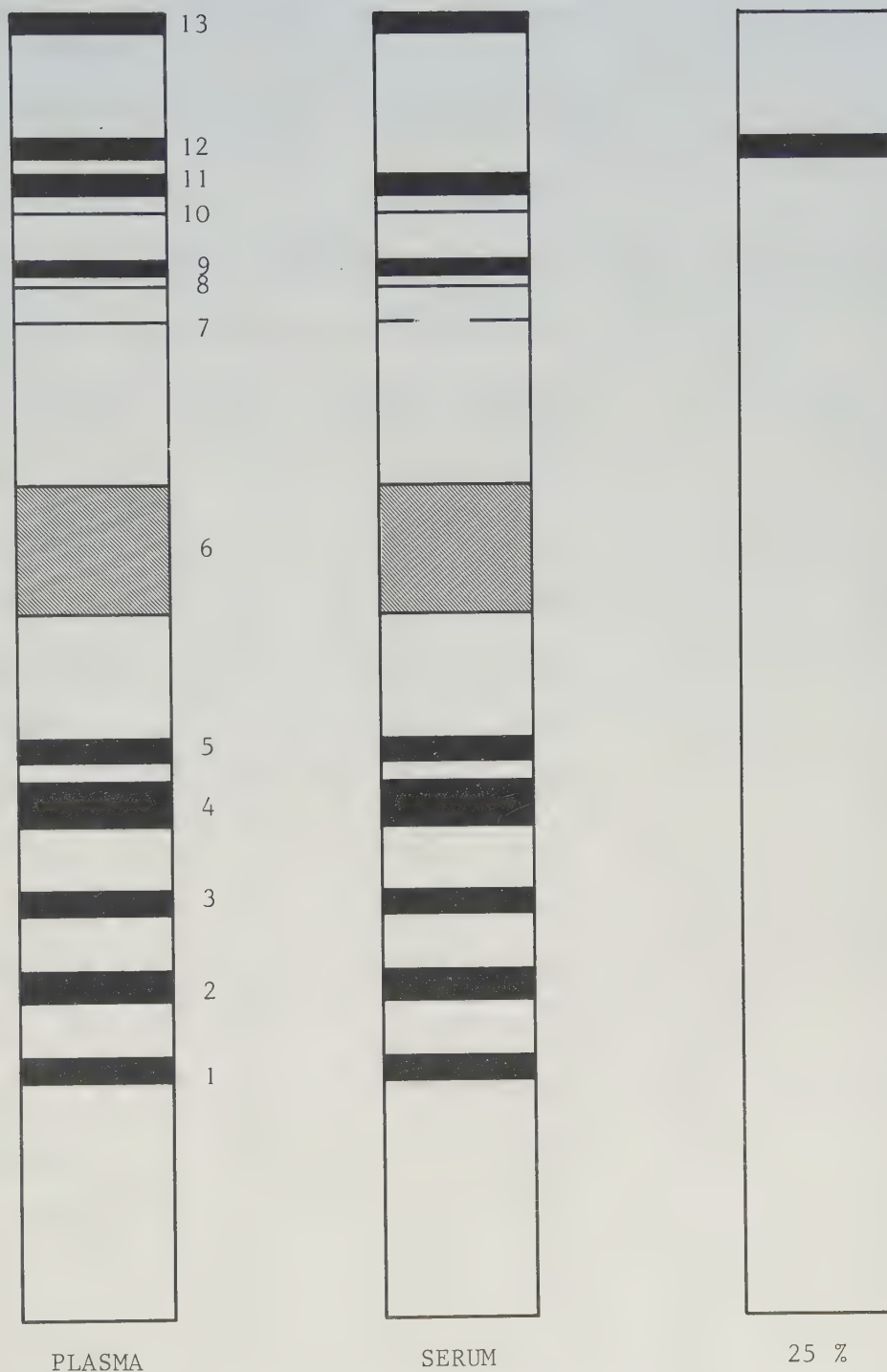
Le fibrinogène précipitant sélectivement pour une concentration de 25 % de sulfate d'ammonium à saturation, nous avons pu l'isoler et étudier sa composition en acides aminés.

L'étude a comporté 5 analyses de fibrinogène provenant de cinq pools de plasmas (3 animaux chacun)

Les résultats sont présentés sur le Tableau n° IV.

Ils sont exprimés en micromoles pour 100 micromoles d'acides aminés présents.

FIGURE n° 13



IDENTIFICATION DU FIBRINOGENE

La fraction 12 est absente dans le sérum et précipite dans le sulfate d'ammonium à 25 % de saturation.

Sur les diagrammes de séparation, il n'existe pas de pic correspondant à la cystine ; toutefois, on a noté la présence d'acide cystéique en quantité très faible.

D'autre part, le taux du tryptophane n'a pu être déterminé, cet acide aminé étant normalement détruit par l'hydrolyse acide.

TABLEAU n° IV

TAUX DES ACIDES AMINES CONSTITUTIFS DU FIBRINOGENE DE LA TRUITE ARC-EN-CIEL

Les valeurs sont exprimées en micromoles pour 100 micromoles d'acides aminés présents.

ACIDES AMINES	VALEURS EXTREMES	VALEUR MOYENNE
LYSINE	7,09 - 7,29	7,19
HISTIDINE	2,12 - 2,26	2,16
ARGININE	4,13 - 4,68	4,42
AC. ASPARTIQUE	10,10 - 11,21	10,65
THREONINE	7,60 - 9,57	8,70
SERINE	8,23 - 8,52	8,38
PROLINE	4,50 - 5,43	4,85
AC. GLUTAMIQUE	10,91 - 11,92	11,39
GLYCINE	10,58 - 12,34	11,51
ALANINE	5,44 - 6,55	6,03
VALINE	5,19 - 6,11	5,58
METHIONINE	1,51 - 1,88	1,65
ISO. LEUCINE	3,41 - 4,31	3,84
LEUCINE	6,51 - 7,48	7,04
TYROSINE	2,84 - 3,75	3,40
PHENYL ALANINE	3,57 - 3,69	3,65

VII - ETUDE DE LA CERULOPLASMINE

Cette recherche a été effectuée en trois étapes :

- identification d'une activité oxydasique dans le gel de polyacrylamide à 9 % de monomère après électrophorèse du plasma.
- dosage du cuivre d'un plasma total et sur des précipités obtenus à diverses concentrations de sulfate d'ammonium.
- dosage de cuivre sur les fractions d'élution du plasma obtenues par chromatographie sur gel de dextran et électrophorèses correspondantes.

1°) Recherche d'une activité oxydasique

&. Evaluation dans le plasma total

Nous avons évalué l'activité oxydasique de 10 plasmas de Truite arc-en-ciel par rapport à celle de 10 plasmas humains. Il existe dans le plasma de truite une activité oxydasique représentant environ 30 % de celle rencontrée dans le plasma humain.

&. Révélation après électrophorèse du plasma

La révélation de l'activité oxydasique a été effectuée sur les gels après électrophorèse du plasma total. Une bande faiblement colorée apparaît au point de départ du gel de séparation, une autre la plus importante, au niveau des bandes 7, 8 et 9, ceci étant déterminé par rapport à un gel coloré. En fait, l'importance du volume de l'échantillon déposé à l'électrophorèse (40 µl) ne nous permet pas une meilleure localisation de l'activité oxydasique. De plus, la réaction colorée est effectuée au bain-marie à 37°. Cette température et la durée de l'incubation sont les causes de la rapide diffusion de la coloration obtenue.

2°) Dosage du cuivre du plasma et des précipités obtenus par le sulfate d'ammonium.

Le dosage du cuivre a été réalisé par absorption atomique. Les résultats sont présentés dans le Tableau n° V. Ils ont été obtenus sur 10 animaux.

TABLEAU n° V

TENEUR EN CUIVRE DU PLASMA TOTAL ET DES PROTEINES PRECIPITANT
POUR UNE CONCENTRATION DE 50 % DE SULFATE D'AMMONIUM A SATURATION.

Les valeurs moyennes sont exprimées en microgrammes pour 100 ml de plasma et sont suivies de l'erreur-type.

NOMBRE DE MESURES 10	$\bar{X} \pm sm$
Cuivre plasmatique total	78,95 $\pm$ 2,15
Cuivre précipitant à 50 %	71,52 $\pm$ 2,88

Le cuivre des protéines précipitant par le sulfate d'ammonium à 50 % de saturation représente donc plus de 90 % du cuivre plasmatique total.

3°) Dosage du cuivre sur les éluats de chromatographie

L'éluat obtenu après chromatographie sur gel de dextran d'un plasma de Truite a été fractionné en 8 parties, correspondant approximativement aux branches ascendantes et descendantes des trois pics et aux fractions d'élution séparant les pics.

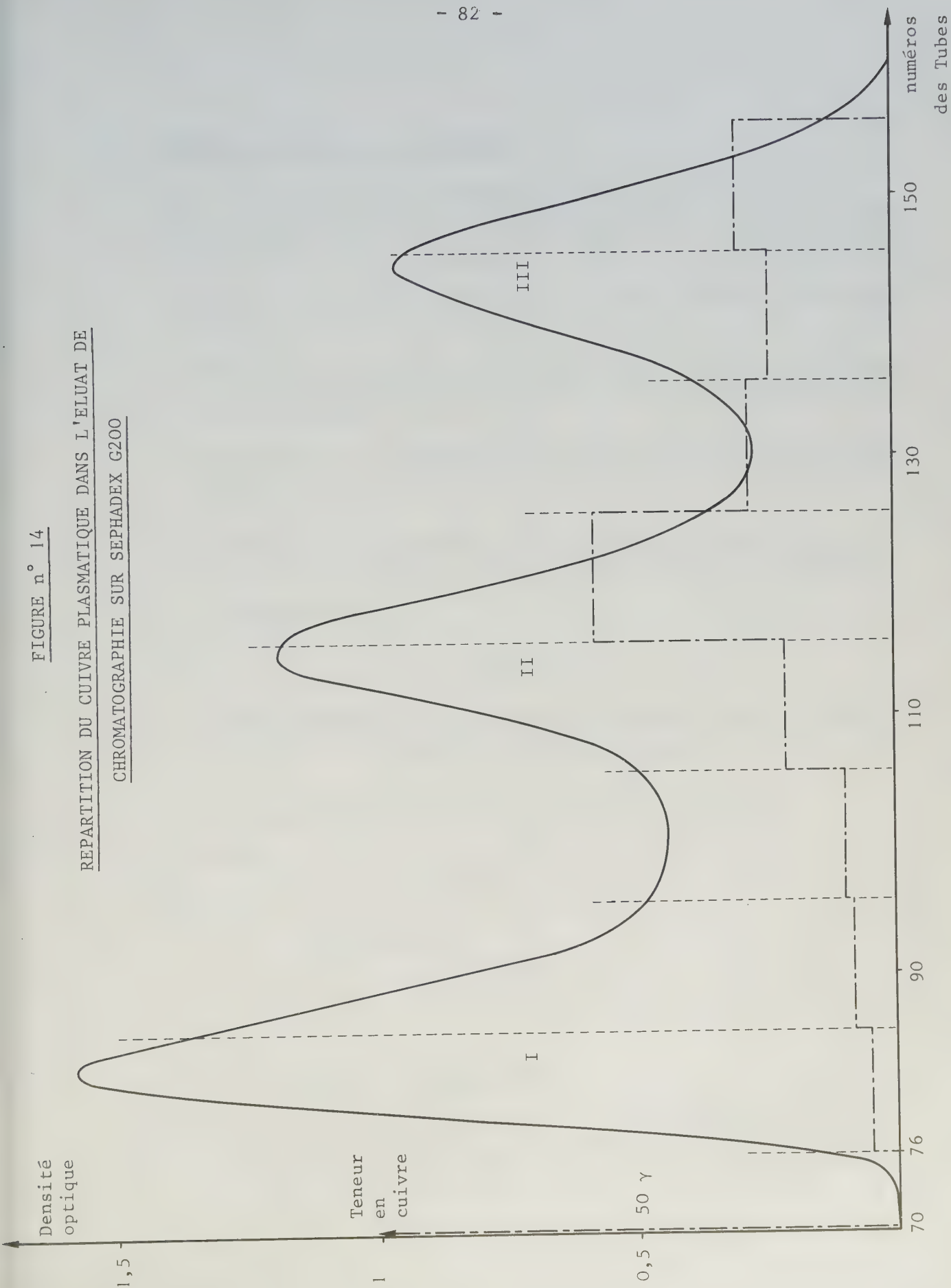
Ce mode opératoire a été décrit précédemment dans le paragraphe concernant la chromatographie. Chacune des fractions a été concentrée et son volume a été ramené à celui du plasma déposé sur la colonne de chromatographie.

Nous avons effectué sur chacune, d'une part, un dosage de cuivre par absorption atomique, d'autre part, une électrophorèse en gel de polyacrylamide à 9 %. Les résultats des électrophorèses ont été décrits précédemment. Nous donnons sur la Figure n° 14 le tracé d'élution obtenu par chromatographie et la courbe de dosage du cuivre de chacune des fractions correspondantes.

Les résultats permettent de déterminer une forte concentration en cuivre dans la partie descendante du deuxième pic d'élution de la chromatographie, où prédominent les fractions 7, 8 et 9. Cependant, les dosages montrent qu'il existe du cuivre dans tous les pics et d'autre part, les rendements des dosages sont mauvais.

FIGURE n° 14

REPARTITION DU CUIVRE PLASMATIQUE DANS L'ELUAT DE
CHROMATOGRAPHIE SUR SEPHADEX G200



VIII - IDENTIFICATION DE LA TRANSFERRINE

Les techniques que nous avons mises en oeuvre pour l'identification de la transferrine nous ont été dictées au fur et à mesure de l'expérimentation, selon les résultats successifs que nous avons obtenus. La méthodologie a été la suivante :

- mise en évidence d'une capacité de liaison du fer dans le plasma de Truite.
- saturation du plasma par le fer radio-actif, puis électrophorèse en gel de polyacrylamide avec comptage sur gels non colorés et sur gels colorés.
- correspondance des résultats avec l'étude par précipitation fractionnée d'un plasma dont la transferrine a été saturée en fer radio-actif.

Nous présentons les résultats selon l'ordre dans lequel nous les avons obtenus de manière à rendre compte du protocole expérimental.

1°) Dosage du fer

TABLEAU n° VI

CONCENTRATION EN FER ET CAPACITE DE LIAISON EN FER DU PLASMA DE TRUITE ARC-EN-CIEL D'ELEVAGE

Les résultats sont exprimés en microgrammes pour 100 ml.
Le tableau donne la moyenne suivie de l'écart-type.

DOSAGES SUR 10 ANIMAUX	$\bar{X} \pm sm$
FER PLASMATIQUE	85,7 $\pm$ 4,9
CAPACITE DE LIAISON EN FER	364,5 $\pm$ 17,1

2°) Electrophorèse sur plasma total

La saturation par la solution de fer radio-actif dont nous disposons a été effectuée de telle manière qu'un dépôt de 4 μ l à l'électrophorèse corresponde en fait à une activité totale de 100.000 coups par minute.

Lors des premières expériences que nous avons réalisées, nous avons effectué le comptage, d'une part, sur des gels dont les fractions protéiques étaient colorées, d'autre part, sur des gels non colorés. Les gels non colorés ont été coupés par rapport aux gels colorés, 48 heures environ après l'électrophorèse, c'est-à-dire le temps nécessaire pour que les fractions de ces derniers soient bien individualisées par l'Amido-Schwarz. Dans le cas des gels colorés, les comptages ont montré des activités extrêmement faibles dont la cause sera discutée ultérieurement. Ces valeurs faibles nous imposaient des temps de comptage assez longs. Dans le cas des gels non colorés, la grande diffusion des fractions protéiques séparées provoquait un étalement de la radio-activité sur plusieurs centimètres du gel, nous empêchant ainsi de localiser avec précision la ou les transferrines. Sans modifier le taux de radio-activité incorporé à l'échantillon, nous avons été amenés à opérer selon des modalités différentes. La cellule électrophorétique dont nous disposions, permettait 8 migrations électrophorétiques simultanées.

. 2 gels ont été colorés par l'Amido-Schwarz puis coupés de manière à individualiser les fractions protéiques séparées par la migration.

. 6 gels non colorés ont été coupés en 5 parties selon le schéma présenté sur la Figure n° 15.

Trois de ces gels ont été à nouveau divisés de telle manière que chacun d'eux donne 18 parties au total.

Les comptages ont été réalisés sur chaque fragment de gel.

Nous donnons Figure n° 15, un exemple des résultats des comptages tels que nous les avons effectués pour une expérience.

Les résultats sont exprimés en nombre de coups par minute, le mouvement propre étant déduit.

&. Résultats pour les gels colorés

Le gel coloré représenté par le schéma (a) montre une faible activité surtout présente dans les bandes de plus grande mobilité électrophorétique. Ces valeurs faibles nous ont obligé à effectuer des comptages pendant une heure.

La plus grande activité se trouve dans la bande 4 où elle représente près de 90 % de l'activité totale du gel entier.

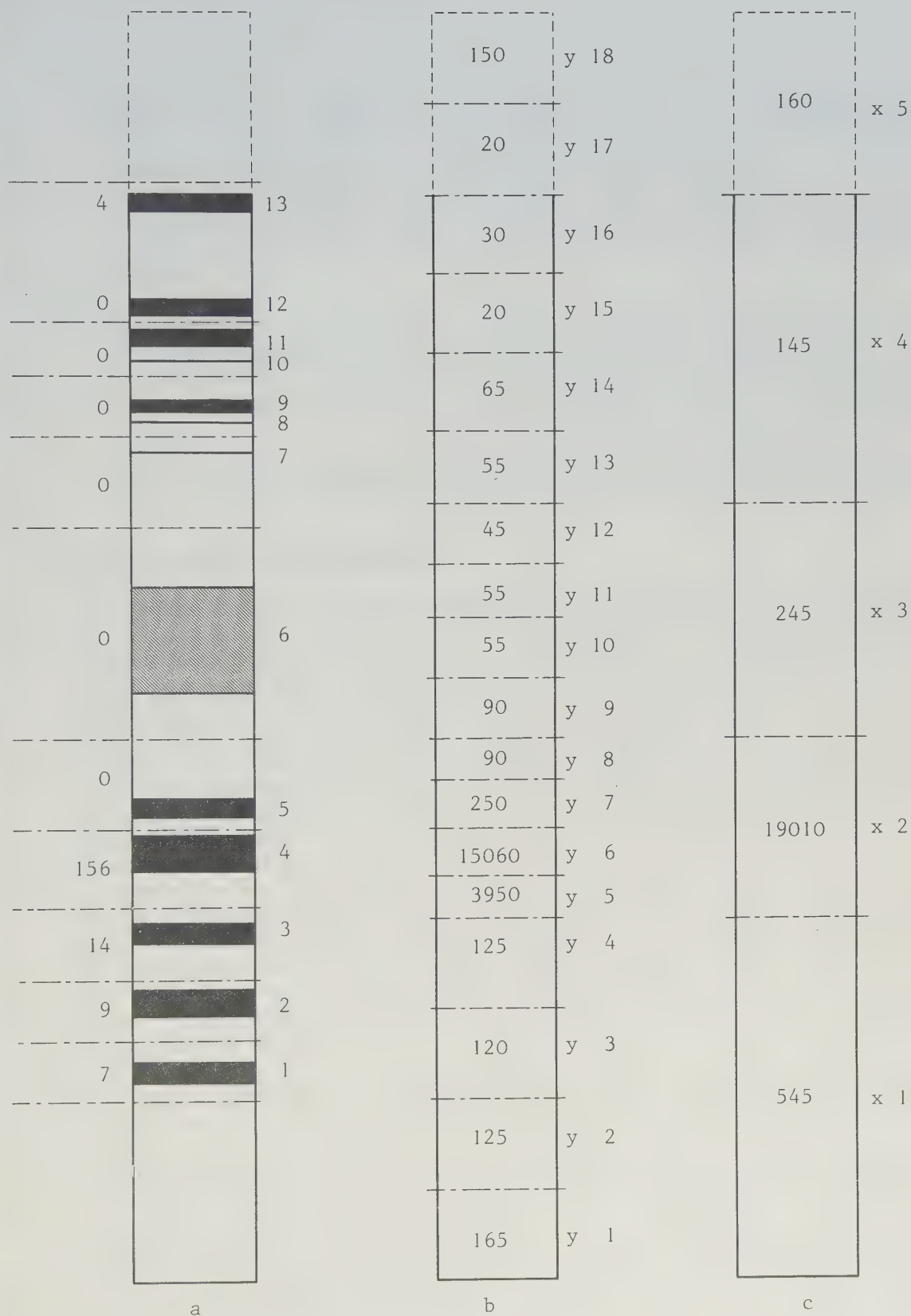
Nous notons cependant les valeurs obtenues pour les fractions protéiques 1, 2 et 3.

&. Résultats pour les gels non colorés

Les temps de comptage ont été de 10 minutes pour chaque fragment.

Le schéma (c) montre les valeurs de l'activité trouvées pour les cinq parties d'un gel non coloré, coupé immédiatement après l'électrophorèse. Toute l'activité est pratiquement localisée dans la partie que nous avons appelée x_2 . Les autres fragments présentent une activité faible.

- 85 -
FIGURE n° 15



EXEMPLE DE COMPTAGE DE RADIO-ACTIVITE SUR UN GEL COLORE ET DES GELS
NON COLORES APRES ELECTROPHORESE D'UN PLASMA CONTENANT DU FER RADIO-ACTIF

Le fragment x_2 contient à lui seul près de 95 % de la radio-activité totale, le fragment x_1 seulement 2,5 %. Cette dernière activité est donc négligeable. Le schéma (b) montre les valeurs de comptage effectué pour chacun des 18 fragments de y_1 à y_{18} .

Les valeurs trouvées sont très comparables aux précédentes. En effet, la somme des activités des fragments y_1 , y_2 , y_3 et y_4 est identique à celle de x_1 , à moins de 2 % près. Il en est de même dans le reste du gel.

Ces résultats permettent de voir que l'activité est concentrée dans les deux fragments y_5 et y_6 . Elle y représente environ 95 % de l'activité totale. Le fragment y_6 correspond à la fraction protéique 4, y_5 ne contenant pas de protéines, du moins sur le plan théorique.

Cette méthode de comptage d'activité sur des fragments de gel permet donc d'affirmer que la transferrine correspond à la fraction protéique 4 de l'électrophorèse.

3°) Précipitations fractionnées

Nous avons mesuré la radio-activité de précipités obtenus par action du sulfate d'ammonium à 45, 60, 65 % de saturation, in situ, sur un plasma dont la transferrine a été préalablement saturée en fer par ^{59}Fe . Après les comptages, chaque précipité a été remis en solution dans le sérum physiologique et soumis à l'électrophorèse.

Les profils électrophorétiques obtenus sont ceux schématisés sur la Figure n° 9, à la différence près que le profil électrophorétique des protéines obtenues avec 45 % de sulfate d'ammonium à saturation comporte la bande 12 puisque nous n'avons pas fait la précipitation à 25 %. Nous avons effectué au Chromoscan sur chacun des profils une mesure densitométrique des bandes 1 à 5.

La bande 3 n'est pas figurée sur ces tracés car le profil électrophorétique des protéines plasmatiques correspondant à l'aspect B décrit Figure n° 3, où la bande 3 est très faible en intensité de coloration. La sensibilité avec laquelle nous avons enregistré le tracé densitométrique ne nous permettait pas de la retrouver.

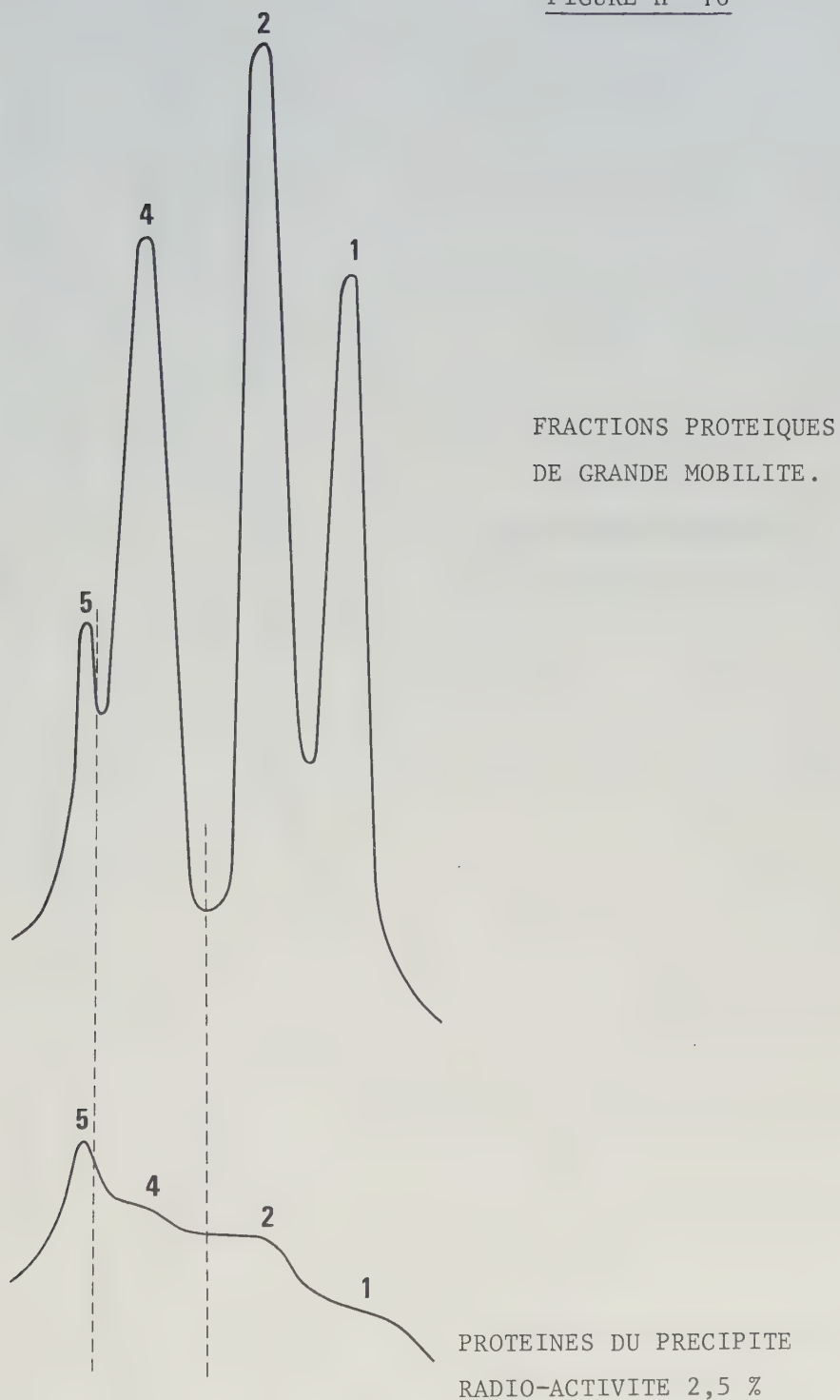
Ces résultats sont présentés sur les Figures n° 16, 17 et 18. Nous y avons rappelé chaque fois le tracé obtenu pour l'ensemble de ces fractions.

Nous avons mentionné les comptages de radio-activité exprimée en pourcentage de la radio-activité totale du plasma.

La fraction 5 est présente en quantité à peu près identique dans les précipités obtenus à 45 et 60 % de sulfate d'ammonium à saturation.

La fraction 4 est nettement prédominante dans le précipité à 60 %. Or, la radio-activité est plus importante dans le précipité à 60 % de sulfate d'ammonium que dans celui à 45 % : 84,5 % de la radio-activité

FIGURE n° 16



IDENTIFICATION DE LA TRANSFERRINE APRES ELECTROPHORESE

- . Tracé densitométrique des fractions de grande mobilité du plasma total et des protéines séparées par fractionnement au sulfate d'ammonium à 45 % de saturation.
- . Evaluation de la radio-activité.

FIGURE n° 17



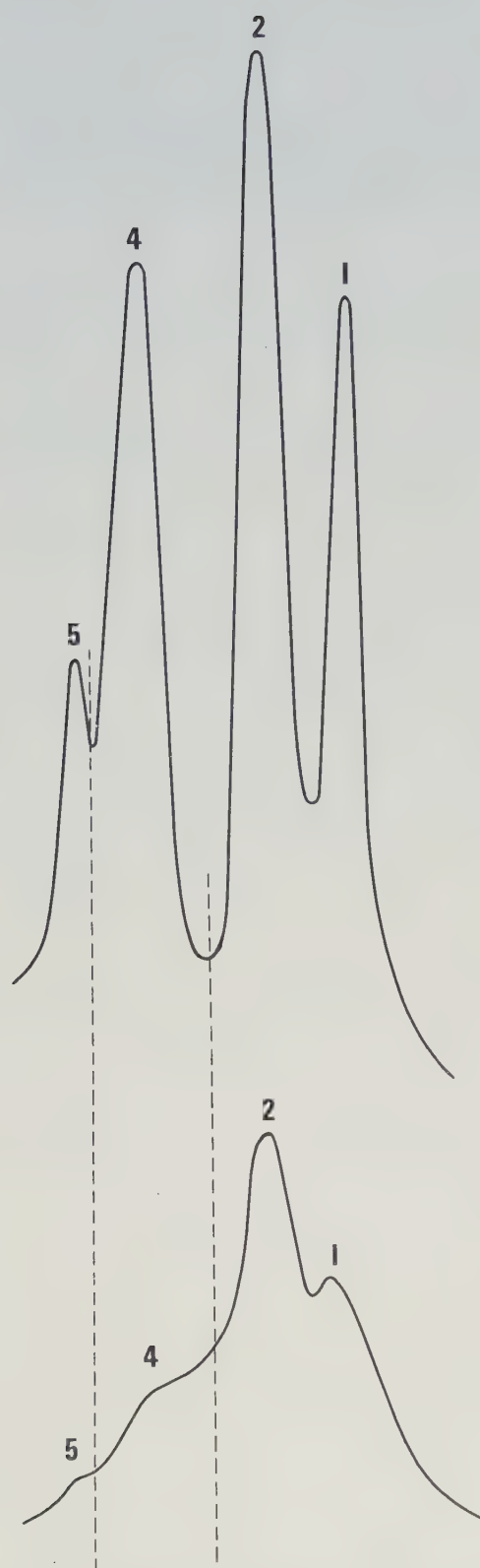
FRACTIONS PROTEIQUES
DE GRANDE MOBILITE.

PROTEINES DU PRECIPITE
RADIO-ACTIVITE 84,5 %

IDENTIFICATION DE LA TRANSFERRINE APRES ELECTROPHORESE

- . Tracé densitométrique des fractions de grande mobilité du plasma total et des protéines séparées par fractionnement au sulfate d'ammonium à 60 % de saturation.
- . Evaluation de la radio-activité.

FIGURE n° 18



FRACTIONS PROTEIQUES
DE GRANDE MOBILITE

PROTEINES DU PRECIPITE
RADIO-ACTIVITE 13,0 %

IDENTIFICATION DE LA TRANSFERRINE APRES ELECTROPHORESE

- . Tracé densitométrique des fractions de grande mobilité du plasma total et des protéines séparées par fractionnement au sulfate d'ammonium à 65 % de saturation.
- . Evaluation de la radio-activité.

totale dans le premier cas, 2,5 % dans le deuxième.
Ceci confirme bien que la transferrine correspond à la fraction 4
du profil électrophorétique.

CHAPITRE IV

DISCUSSION ET INTERPRETATION

I - CONSIDERATIONS GENERALES

La protéinémie des Truites que nous avons utilisées s'est révélée assez constante. La valeur obtenue, $37,4 \pm 0,6$ g/l est peut-être différente de celles obtenues par certains auteurs, notamment par SAIFI (113) qui trouve une protéinémie de $31,9 \pm 1,2$ g/l. Il faut remarquer que nos dosages ont été effectués sur le plasma des animaux et non sur le sérum. D'autre part, il faut souligner le rôle important de la nourriture des animaux, tant sur le plan qualitatif que sur le plan quantitatif, et l'influence de celle-ci sur la protéinémie.

Nous avons pris soin de recueillir des volumes peu différents d'un animal à l'autre, environ 3 ml car nous avons estimé qu'un prélèvement plus important pouvait entraîner une hémodilution. De même, nous n'avons pas tenu compte des résultats obtenus pour des animaux présentant une décoloration des branchies, car dans ce cas la protéinémie est anormalement basse.

Nous n'avons pas effectué d'étude systématique des variations saisonnières et de l'influence du sexe des animaux sur la protéinémie, mais les résultats accumulés pendant toute la durée de notre travail ne semblent pas montrer de variation due à l'influence de ces facteurs.

Les dosages ont révélé la forte teneur en lipides totaux du plasma de la Truite. En effet, si l'on établit le rapport lipides/protéines, on s'aperçoit qu'il est approximativement de 30 % alors qu'il est pour le plasma humain inférieur à 10 %.

De même, les taux des composés lipidiques sont différents, comme nous avons pu le constater par les dosages effectués après chromatographie en couche mince.

Si les taux de glycérides sont comparables, en pourcentage, on voit que le cholestérol et ses esters sont en proportion moindre. Par contre, les phospholipides sont à un taux légèrement supérieur, 40 % environ chez la Truite arc-en-ciel, 30 % dans le plasma humain. Or, ceux-ci participent à la stabilité des lipoprotéines plasmatiques. Il est intéressant de constater sans tirer de conclusion hâtive, le rapport cholestérol/phospholipides. Il est de 1 pour le plasma humain et de 1,5 à 2 pour le plasma de Truite.

On attache beaucoup d'importance au taux de cholestérol dans le plasma humain, en ce qui concerne la pathogénie de l'athérosclérose. Il semble bien que ce ne soit pas seulement cette teneur en cholestérol qui compte, mais la nature des lipoprotéines par lesquelles il est transporté, certaines favorisant le dépôt, d'autres non. Il y a donc grand intérêt à comparer ces lipoprotéines dans des espèces où l'on observe l'athérosclérose et dans les espèces où l'on n'en observe pas.

Les Poissons appartiennent à cette catégorie, bien que les concentrations en lipoprotéines soient très grandes. C'est ainsi que le Saumon du Pacifique présente dans son sérum vingt fois plus de lipoprotéines que le plasma humain (48).

Chez l'homme une telle concentration entraînerait des désordres importants au niveau du système circulatoire.

La chromatographie des lipides du plasma de Truite permet en outre de mettre en évidence deux fractions lipidiques supplémentaires. L'une migre comme un témoin oléate d'éthyle ; cependant rien ne permet d'affirmer qu'il s'agit d'esters d'alcools à courte chaîne. L'autre fraction lipidique migre comme un témoin palmitate de cétyle, il pourrait donc s'agir de cérides.

Il faut noter aussi l'importance de la tache donnée, après coloration par les hydrocarbures. Leur composition reste encore à établir.

II - ASPECT GENERAL DU DIAGRAMME ELECTROPHORETIQUE

Nous avons cité treize fractions constantes, dont nous avons déterminé l'existence après électrophorèse des protéines de 400 plasmas environ. Ces fractions sont bien définies et nous pourrions en établir ultérieurement une classification.

Parmi ces treize fractions constantes, il faut noter les variations pouvant exister pour les fractions 7, 8, 9 et 10. Elles présentent des modifications d'intensité de coloration d'un animal à l'autre. Les lots d'animaux dont nous disposions étaient bien standardisés, ce qui fait qu'en dehors des variations individuelles, les variations observées n'auraient pu être mises en relation qu'avec celles dues au cycle saisonnier et au sexe des truites.

Or, nous n'avons pas remarqué de variations saisonnières. Ceci est en contradiction avec les constatations de plusieurs auteurs (71, 120). Il faut souligner cependant que les animaux que nous avons utilisés provenaient d'un Etablissement de Pisciculture où les bassins étaient ali-

mentés par une eau de source de température constante 10°. Les truites y recevaient une nourriture régulière, en quantité et en qualité. Il en était de même au Laboratoire. De ce fait, l'influence du cycle saisonnier peut être minime. La présence dans le diagramme électrophorétique, d'une bande caractéristique du sexe a été relatée par THURSTON (120). Nous n'avons pas retrouvé un tel résultat. Ceci peut provenir du fait que nous avons utilisé des animaux immatures alors que l'auteur cité disposait de Truites arc-en-ciel de maturité très variable. De même, nous n'avons pas observé de modifications dans l'intensité de coloration des bandes en fonction du sexe. En fait, les techniques d'analyse ont été différentes et il est difficile d'établir des comparaisons entre ces divers travaux, d'autant plus qu'il s'agit de fractions représentant une petite quantité de protéines.

En plus des 13 fractions constantes, nous avons remarqué dans les diagrammes électrophorétiques, la présence de 3 bandes supplémentaires, de mobilité moyenne qui n'existent pas chez tous les animaux. Ces fractions protéiques sont toujours faiblement colorées et la fréquence de leur présence n'a pu être établie. Leur apparition n'a pas été rattachée à une cause définie, sexe, variations saisonnières, par exemple. Leurs distances de migration semblent assez constantes. Elles ne sont pas toutes présentes à la fois dans un même profil électrophorétique. Ceci peut être expliqué par le fait qu'il s'agit de fractions d'importance faible : notre méthode de coloration n'est peut être pas assez sensible pour rendre visibles celles qui paraissent manquer.

L'étude de telles fractions pourra être améliorée par l'utilisation de colorants plus sensibles, comme le Bleu de Coomassie par exemple, qui est trois fois plus sensible que l'Amido-Schwarz. Il serait donc préférable de l'utiliser pour des études plus complètes des diagrammes électrophorétiques.

III - CARACTERES PHYSICO-CHIMIQUES

1°) Conservation des plasmas

Les études que nous avons réalisées concernant la conservation des plasmas nous ont permis de constater la fragilité des protéines.

Si la conservation à + 4° pendant 4 jours n'apporte aucune modification du profil électrophorétique, il n'en est pas de même de la conservation par congélation. Ce procédé met en évidence certaines modifications provoquant l'apparition de nouvelles fractions, de mobilités électrophorétiques élevées. L'importance quantitative de ces bandes est faible.

Les plasmas exposés à la température du Laboratoire, environ 20°, sont fortement modifiés tant dans leur aspect que dans leur composition. Il convient donc d'utiliser les plasmas le plus rapidement possible après leur obtention, comme nous l'avons toujours fait.

2°) Résistance à la chaleur

L'exposition à la chaleur à laquelle nous avons soumis les protéines plasmatiques de la Truite arc-en-ciel nous a montré d'importantes modifications du diagramme électrophorétique. La température que nous avons choisie, 55°, après des essais préliminaires est celle qui donne la meilleure sélectivité.

Malgré cela, l'interprétation des diagrammes électrophorétiques est rendue complexe surtout par l'apparition de nouvelles bandes. Celles-ci sont constituées de protéines dont les mobilités électrophorétiques sont modifiées par action de la chaleur.

Nous convenons de considérer comme thermostables des fractions qui sont encore visibles après exposition à 55° pendant 120 minutes, et qui sont donc peu modifiées en 30 minutes. Dans ces conditions, les fractions thermostables sont les fractions 2, 3, 5, 6, 9 et 13.

Il faut remarquer que la fraction 6 qui n'est pas retrouvée après précipitation par le sulfate d'ammonium à saturation et après chromatographie sur gel de dextran est thermostable.

En ce qui concerne la bande 13, il est impossible de déterminer sa résistance à la chaleur car les protéines dénaturées se rassemblent à l'électrophorèse à ce niveau du gel.

3°) Fractions perchlorosolubles

Nous avons effectué des essais préliminaires avec des concentrations en acide perchlorique plus élevées que celle que nous avons finalement choisie (0,2 N).

Avec la concentration d'acide perchlorique utilisée pour les protéines du plasma humain (0,6 N), nous n'avons pu déterminer aucune fraction perchlorosoluble chez la Truite arc-en-ciel. Par contre, la concentration que nous avons choisie permet de séparer trois fractions perchlorosolubles. Il s'agit des fractions 2, 3 et 5. Il faut remarquer que ces trois fractions ont, à des degrés différents, une nature glycoprotéique, comme c'est le cas pour les protéines du plasma humain solubles dans l'acide perchlorique.

IV - ESTIMATION DES POIDS MOLECULAIRES

Les techniques de séparation que nous avons utilisées, chromatographie sur gel de dextran et électrophorèse en gel de polyacrylamide permettent une évaluation approximative des poids moléculaires des protéines plasmatiques. L'élution des protéines est faite dans l'ordre décroissant des masses moléculaires. L'utilisation des colonnes de gel de dextran pour la détermination des masses moléculaires n'est valable que pour les protéines globulaires. En effet, des facteurs géométriques interviennent lors du passage des protéines dans les pores du gel. Les travaux de FLODIN (47) montrent que le gel le plus approprié en vue de cette détermination est le Sephadex G 100 car il existe une relation linéaire entre le poids moléculaire et le volume d'élution pour des valeurs comprises entre 40.000 et 130.000.

De plus, la présence de glucides dans la protéine augmente l'erreur de la mesure. Il est nécessaire d'établir des étalonnages en vue de déterminations précises.

Néanmoins, pour les diagrammes d'élution obtenus, il nous a semblé possible de déterminer des intervalles de poids moléculaires pour les protéines contenues dans les trois pics.

Le pic III qui a le volume d'élution le plus grand, renferme les composés ayant les poids moléculaires les plus faibles. Si l'on voulait estimer ces poids moléculaires, on pourrait dire qu'ils se situent entre 40.000 et 100.000.

Le pic II renferme les protéines de poids moléculaires moyens, compris entre 100.000 et 250.000.

Le pic I comprend les molécules exclues des pores du gel de dextran soit des composés de poids moléculaires supérieurs à 250.000.

Les électrophorèses réalisées avec les protéines contenues dans ces pics montrent que la séparation électrophorétique en gel de polyacrylamide est en accord avec la chromatographie sur le plan des poids moléculaires.

Les fractions les plus rapides sont celles du pic I, les protéines de mobilité moyenne sont contenues dans le deuxième pic d'élution et celles de mobilité faible ou nulle dans le pic III.

Pour la bande centrale (fraction 6), l'électrophorèse en gradient de concentration d'acrylamide montre qu'elle migre comme l'haptoglobine 1-1 dont le poids moléculaire est de 100.000.

Il ressort de ces constatations que les poids moléculaires des protéines du plasma de Truite, sont de même ordre de grandeur que ceux des protéines du plasma humain. Nous n'avons pas tenu compte des fractions très rapides, signalées dans le chapitre précédent ; leurs poids moléculaires sont certainement inférieurs à 40.000.

V - ETUDE INDIVIDUELLE DE DIVERSES FRACTIONS PROTEIQUES

1°) Les glycoprotéines

La technique de révélation des glycoprotéines que nous avons utilisée nous a permis d'identifier en gel à 9 % d'acrylamide, six fractions de cette nature. Il s'agit des fractions 1, 4, 5, 6, 11 et 13. Cependant, la réaction de Schiff se traduit par une coloration dont l'intensité est en rapport avec la concentration de glucides. De ce fait, en augmentant le volume de plasma soumis à l'électrophorèse, nous pouvons mettre en évidence la nature glycoprotéique de fractions ayant une copule glucidique de plus faible importance. Il en est ainsi des fractions 2 et 3.

La fraction 13, de mobilité nulle, est scindée en gel à 5,5 % de monomère en plusieurs fractions, elles-aussi de nature glycoprotéique. Nous remarquons donc la présence, dans le plasma de Truite de nombreuses protéines ayant dans leur structure une copule glucidique. La présence importante de glucides a déjà été signalée chez d'autres espèces de Poissons, notamment chez la Roussette, *Scyllium stellare*, et le Congre, *Conger vulgaris* (53).

Nous n'avons pas effectué, comme dans ces travaux des dosages d'oses et d'acides sialiques.

2°) Les lipoprotéines

Nous avons remarqué dans un paragraphe précédent la forte teneur en lipides du plasma de la Truite arc-en-ciel.

L'identification des lipoprotéines en gel à 9 % de monomère montre qu'il s'agit de deux groupes de molécules : celle de mobilité électrophorétique moyenne, et celles de mobilité électrophorétique nulle.

La fraction 6 est donc composée de lipoprotéines de poids moléculaire voisin de celui de l'haptoglobine humaine. D'après l'intensité de la coloration, la teneur en lipides de cette fraction est importante. Les macromolécules, sont représentées par la fraction 13, ne migrant pas dans le gel à 9 %.

Par contre, elle peut être scindée en gel à 5,5 %, et donne deux fractions lipoprotéiques de faible intensité auxquelles il faut ajouter les lipoprotéines de migration nulle. Ces dernières n'ont pas une partie protéique très importante puisque l'Amido-Schwarz ne les colore pas, du moins pour le volume de plasma que nous avons soumis à l'électrophorèse. Toutes les lipoprotéines représentées par la fraction 13 sont exclues lors de la gel filtration. Il faut remarquer que toutes les fractions lipoprotéiques, exceptée l'une d'entre elles, obtenues en gel à 5,5 % de monomère, sont aussi de nature glycoprotéique. Ceci rejoint les constatations de DUFOUR et BARETTE

(37) tendant à prouver qu'il n'existe pas dans le plasma de Truite arc-en-ciel d'individualité des lipoprotéines. L'étude de ces lipoprotéines devra être poursuivie en utilisant la technique d'ultra-centrifugation qui permet une meilleure séparation de ces composés.

3°) Le fibrinogène

Le fibrinogène de la Truite arc-en-ciel présente de grandes similitudes avec le fibrinogène humain, tant sur le plan de ses propriétés physico-chimiques que sur celui de sa composition en acides aminés.

Les travaux de DOOLITTLE et SURGENOR (33) concernant la coagulation du sang chez les Poissons montrent que le fibrinogène de plusieurs espèces peut être transformé en fibrine par l'action de la thrombine humaine. Il semble donc normal qu'il y ait une certaine similitude entre les facteurs plasmatiques de la coagulation chez les Poissons et chez l'Homme.

Chez la Truite arc-en-ciel, le taux de fibrinogène plasmatique est de 2,2 g/l (44).

Le fibrinogène constitue la fraction 12 du profil électrophorétique des protéines plasmatiques. Il s'agit donc d'une protéine de poids moléculaire assez élevé, se trouvant dans le pic d'exclusion de la gel-filtration.

Comme le fibrinogène humain, il est totalement précipité par le sulfate d'ammonium à 25 % de saturation (20).

Nous n'avons pas pu mettre en évidence le caractère glycoprotéique de cette molécule. Ceci n'est pas étonnant, si l'on considère que la copule glucidique du fibrinogène humain ne représente que 3 % de la molécule totale. Cette teneur expliquerait l'absence de coloration visible avec le réactif de Schiff dans les conditions opératoires que nous avons adoptées.

L'étude de la stabilité montre qu'il s'agit d'une molécule assez fragile, dénaturée par la chaleur et l'acide perchlorique 0,2 N.

L'étude de sa composition en acides aminés permet de poursuivre de manière intéressante la comparaison avec le fibrinogène humain. Nous présentons dans le Tableau n° VII une comparaison avec les taux d'acides aminés constitutifs du fibrinogène humain, d'après TRISTAM (122). Les valeurs sont exprimées en g/pour 100 g. d'acides aminés. Nous voyons pour chaque amino-acide des valeurs assez voisines, en particulier pour l'histidine, la sérine et la leucine. Les seules différences notables concernent l'acide aspartique, la thréonine et l'arginine. Il faut remarquer cependant, que les conditions expérimentales ne sont pas tout à fait identiques. De plus, afin de pouvoir réaliser une comparaison, nous

avons exprimé nos résultats pour 100 grammes d'acides aminés alors que les valeurs de TRISTAM sont données en grammes d'acides aminés pour 100 grammes de fibrinogène initial.

Il semble intéressant de poursuivre cette étude comparative avec des fibrinogènes d'autres espèces de Poissons. Cette étude est actuellement en cours.

TABLEAU n° VII

COMPARAISON ENTRE LES VALEURS EXPRIMEES EN G. POUR 100 GRAMMES DES
ACIDES AMINES CONSTITUTIFS DU FIBRINOGENE DE TRUITE ARC-EN-CIEL ET DU
FIBRINOGENE HUMAIN.

	TRUITE	HOMME
LYSINE	8,3	9,2
HISTIDINE	2,6	2,6
ARGININE	6,1	7,8
AC. ASPART.	11,2	13,1
THREONINE	8,2	6,1
SERINE	7,0	7,0
PROLINE	4,4	5,7
AC. GLUTAM.	13,2	14,5
GLYCINE	6,8	5,6
ALANINE	4,2	3,7
VALINE	5,2	4,1
METHIONINE	1,9	2,6
ISO LEUCINE	4,0	4,8
LEUCINE	7,3	7,1
TYROSINE	4,9	5,5
PHENYLALANINE	4,8	4,6

4°) La céruloplasmine

Nous avons localisé sur le gel de polyacrylamide d'une manière approximative une zone douée de propriétés oxydasiques au niveau des fractions 7, 8 et 9.

L'activité oxydasique du plasma est partagée entre cette fraction et la fraction 13 du diagramme électrophorétique. Elle représente environ 30 % de celle d'un plasma humain ; mais les teneurs en cuivre sont du même ordre de grandeur. Si le nombre d'atomes de cuivre de la céruloplasmine de Truite est identique à celui de la céruloplasmine humaine, il faut donc admettre que la majeure partie du cuivre plasmatique de la Truite est fixée de manière non spécifique par toutes les protéines. Ceci expliquerait les résultats des dosages que nous avons effectués sur les éluats de la chromatographie sur gel de dextran. Ces résultats sont représentés par une courbe sur la Figure n° 14.

Nous n'avons pas pu déterminer exactement la fraction représentant la céruloplasmine pour plusieurs raisons.

L'aspect du profil électrophorétique dans cette partie du gel est assez complexe. Les fractions protéiques sont nombreuses et tassées sur une courte distance. Or, la coloration obtenue par l'activité oxydasique est diffuse, d'autant plus que le volume d'échantillon soumis à l'électrophorèse est grand. La gel-filtration n'est pas utilisable car toutes ces protéines sont de poids moléculaires voisins et sont éluées dans le deuxième pic de chromatographie.

L'utilisation des caractères physico-chimiques n'est pas non plus satisfaisante, les fractions présentant toutes des caractères de thermostabilité partielle. Ceci explique que la céruloplasmine ne peut être déterminée parmi les fractions 7, 8 et 9.

Il faut remarquer qu'aucune de ces trois fractions n'est de nature glycoprotéique contrairement à la céruloplasmine humaine.

Mis à part, le problème de la thermostabilité, ces trois fractions 7, 8 et 9 ont des propriétés identiques et notamment précipitent sous l'action du sulfate d'ammonium à 40 % de saturation.

Nous n'avons pas pu utiliser une détermination par le cuivre radioactif ^{64}Cu car sa période est trop courte (12,8 heures) par rapport au temps nécessaire à la coloration des gels. De plus, il aurait fallu injecter la solution radio-active à l'animal et la fixation non spécifique du cuivre sur toutes les fractions protéiques n'aurait pas permis une localisation précise de la céruloplasmine.

L'isolement de la céruloplasmine peut être envisagé par chromatographie sur résine échangeuse d'ions.

5°) La transferrine

La transferrine a été identifiée dans le profil électrophorétique des protéines du plasma par l'utilisation de fer radio-actif. Les comptages de radio-activité effectués sur les gels montrent qu'elle est représentée par la fraction 4.

Les valeurs données pour ces comptages sont très différentes selon que le gel a été soumis ou non à la coloration. Cette différence peut être expliquée par l'action de l'acide acétique des différents bains de coloration. Cet acide provoquerait des ruptures de liaison entre le fer et la transferrine, ce qui entraîne la faible activité des gels colorés.

D'autre part, nous constatons que les autres bandes du diagramme présentent, une faible radio-activité. Il est probable que lors de la saturation en fer de la transferrine, l'isotope se fixe d'une manière non spécifique sur les autres protéines du plasma.

Notre étude a porté sur 12 animaux et nous n'avons jamais constaté de mobilités électrophorétiques différentes pour la transferrine. Il existe pourtant plusieurs phénotypes chez la Truite arc-en-ciel (46), qui d'ailleurs sont utilisés pour le typage des populations. Si nous n'avons pas pu les mettre en évidence, ceci vient du fait que nous disposions de lots d'animaux parfaitement homogènes.

Nos travaux permettent de donner quelques propriétés physico-chimiques de la transferrine de Truite. Il s'agit d'une molécule de nature glycoprotéique. L'intensité de la coloration obtenue par le réactif de Schiff montre que la partie glucidique est assez importante quantitativement. Cette transferrine est insoluble presque totalement dans le sulfate d'ammonium à 60 % de saturation. Elle est facilement dénaturée, soit par la chaleur, ceci assez rapidement puisqu'elle est partiellement détruite en 30 minutes à 55°, soit par l'acide perchlorique 0,2 N. Son poids moléculaire est assez faible. En effet, la mobilité électrophorétique de cette molécule est élevée et d'autre part, elle est retrouvée dans le troisième pic d'élution de la chromatographie sur gel de dextran.

Ces résultats sont en correspondance avec ceux donnés dans la littérature. Les travaux de FINE et coll. (46) montrent que la transferrine de la Truite arc-en-ciel migre avec les fractions α_2 globulines-like. Il serait intéressant d'étudier la structure de cette molécule, notamment de la copule glucidique comme cela a été fait chez la Roussette (54). Il semblerait qu'il y ait des similitudes importantes entre la transferrine humaine et celle de plusieurs espèces de Poissons.

6°) La fraction dite "Albumine"

Les auteurs ont appelé ainsi, la fraction protéique du plasma des Poissons ayant le plus grande mobilité électrophorétique, par comparaison avec l'albumine humaine.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide des protéines du plasma de truite met en évidence trois fractions (fractions 1, 2 et 3), formant un groupe présentant une homogénéité sur le plan des poids moléculaires. En effet, ces trois fractions apparaissent simultanément dans le pic III de la gel-filtration. De plus, elles précipitent toutes pour des concentrations de 65 % de sulfate d'ammonium à saturation. Ce groupe de fractions semble correspondre à la fraction dite albuminique séparée par électrophorèse sur papier ou sur acétate de cellulose. La comparaison des mobilités électrophorétiques de ces fractions du plasma de Truite et de la sérum albumine humaine montre qu'il s'agit de protéines de poids moléculaires de même ordre.

Si les poids moléculaires sont voisins, il existe néanmoins des différences quant aux caractères physico-chimiques. En effet, la fraction 1 a une structure glycoprotéique marquée par rapport aux deux autres. Il faut noter que ceci constitue un caractère différentiel par rapport à l'albumine humaine qui ne renferme pas de copule glucidique.

De plus, la résistance à la dénaturation est différente pour les trois fractions. La thermostabilité est plus importante pour les fractions 2 et 3 que pour la fraction 1. Ceci constitue une deuxième différence avec l'albumine humaine qui n'est pas dénaturée après 10 heures de chauffage à 60° (24).

L'étude de la conservation des plasmas à la température ambiante, montre une bonne stabilité des 3 fractions. L'action de l'acide perchlorique 0,2 N permet de distinguer les fractions 2 et 3, perchlorosolubles de la fraction 1 qui est dénaturée.

L'ensemble de ces propriétés physico-chimiques montre que ce groupe de fractions de mobilité électrophorétique élevée est hétérogène. Il ne peut pas être comparé à la fraction albuminique des Mammifères.

Nous pouvons cependant établir des rapprochements d'ordre physiologique. Le rapport albumine/globuline du plasma humain est supérieur à 1 dans tous les cas, alors que chez la Truite et les Poissons en général, il est au contraire inférieur à 1.

La fraction dite albuminique subit d'énormes variations quantitatives. Liée de manière très intime à l'état de nutrition de l'animal, elle subit des variations dont l'amplitude est considérable. Nous pouvons citer à ce sujet les travaux de KORALEVA et DRILHON (35, 71) chez la Truite arc-en-ciel d'élevage. Il faut trente jours à des Truites de 250 grammes pour que la fraction dite albuminique disparaisse complètement du diagramme électrophorétique des protéines plasmatiques. Il serait intéressant d'étudier séparément les variations des fractions 1, 2 et 3 en fonction de la nutrition de l'animal.

Les rôles biologiques de l'albumine chez les Poissons et chez la Truite en particulier sont à peu près inconnus. Les travaux de LELOUP (77, 78) et ceux de HUANG et HICKMAN (64) ont montré le rôle de transporteur d'iode inorganique, et nous-même avons noté la présence de cuivre dans cette fraction. Il semblerait donc que cette fraction albumine-like ait un rôle identique à celui de l'albumine humaine, notamment un rôle de transporteur d'ions mais aussi un rôle dans l'équilibre osmotique du plasma.

7°) La bande centrale (fraction 6)

Dans la plupart des diagrammes électrophorétiques, la fraction 6 constitue une bande large, diffuse mais homogène. Cependant, il existe des variations notables. Ainsi, après coloration à l'Amido-Schwarz, nous voyons apparaître surtout aux extrémités de la bande des fractions plus individualisées. Nous retrouvons cet aspect chez d'autres espèces de Poissons que nous avons étudiées comme le Brochet, le Chevesne, et le Rotengle. Ce polymorphisme ne peut pas être expliqué d'après les études que nous avons réalisées. A notre connaissance, la présence de cette fraction originale (fraction 6) n'a jamais été signalée. Il s'agit pourtant d'une fraction parfaitement homogène puisqu'elle n'est pas scindée par électrophorèse en gradient de concentration d'acrylamide. Elle est toujours de nature glycolipoprotéique, et a un poids moléculaire de l'ordre de 150.000. Son étude analytique s'avère difficile voire même impossible. En effet, les caractères physico-chimiques qu'elle possède ne permettent pas sa séparation. Nous ne l'avons pas retrouvée après traitement du plasma par diverses concentrations de sulfate d'ammonium, ni par chromatographie sur gel de dextran. Cette instabilité marquée n'est pas constatée lors de l'étude des dénaturations. Elle n'est pas de nature perchlorosoluble mais elle est partiellement thermostable : elle reste présente sur le gel, quoique réduite, après traitement du plasma à 55° pendant 120 minutes.

Il faut noter l'importance quantitative de cette fraction. D'après l'intensité de coloration, on peut admettre qu'elle contient la moitié des lipides circulants soit environ 5 g/l. De plus, il faut tenir compte de la fraction glucidique qui est elle-aussi importante. Ces éléments réunis permettent d'estimer qu'elle représente 10 g/l environ des protéines totales du plasma.

La bande centrale (fraction 6) constitue une originalité dans le profil électrophorétique des protéines plasmatiques de la Truite arc-en-ciel d'élevage et de nombreuses autres espèces par rapport aux Mammifères. Elle semble être une caractéristique du plasma de ces Poissons.

VI - ESSAIS DE LOCALISATION D'AUTRES FRACTIONS PROTEIQUES PLASMATIQUES

Dans le cadre de l'étude analytique du profil électrophorétique des protéines du plasma de la Truite, nous avons envisagé de déterminer la localisation d'immunoglobulines, d'une protéine de liaison des iodures et la recherche d'une haptoglobine. Ces études n'ont pas été développées pour diverses raisons que nous allons évoquer successivement.

1°) Les immunoglobulines

Nous avons tenté d'immuniser huit truites par injection hebdomadaire de sérum-albumine humaine additionnée d'adjuvant de Freund à raison de 50 mg par animal par voies intra-péritonéale et intramusculaire. Le taux important de mortalité nous a obligé d'arrêter l'immunisation après la 3ème injection. Les recherches effectuées par immuno-précipitation en gélose n'ont pas montré la présence d'anticorps et nous avons donc dû abandonner cette voie de recherche. La faible réponse immunologique de la truite concernant la formation d'anticorps précipitants avait été précédemment signalée par HODGINS et coll. (62). Ces auteurs n'ont constaté qu'un seul cas d'immunisation à la sérum-albumine bovine pour 11 animaux après 70 jours de traitement. Ils ont pu montrer que les anticorps précipitants étaient présents dans le premier pic d'élution de gel filtration.

2°) La protéine de liaison des iodures

Cette molécule citée par LELOUP (77, 78) migre à l'électrophorèse sur papier avec la fraction albumine-like. La liaison des iodures se ferait avec une molécule d'un poids moléculaire d'environ 70.000. Nous n'avons pas pu réaliser cette étude à cause de la fragilité de la liaison entre l'iodure et la protéine. Les travaux de HUANG et HICKMAN (64) utilisant l'iode radio-actif ^{125}I sous forme de iodure de sodium montrent que le complexe iodure-protéine est dissocié par électrophorèse au-delà d'un temps de migration de 30 minutes avec un courant de 3 mA. Dans ces conditions, il nous était impossible d'obtenir en gel de polyacrylamide une séparation suffisante pour identifier cette protéine de liaison des iodures.

La technique de précipitation fractionnée par le sulfate d'ammonium à saturation est également inutilisable. En effet, les fractions 1, 2 et 3 ont la même solubilité ; il est donc impossible de les différencier par ces conditions expérimentales.

3°) L'haptoglobine

Nous avons effectué des électrophorèses en gel de polyacrylamide à 9 % sur des solutions de protéines plasmatiques et d'hémoglobine

de Truite pour diverses concentrations. Nous n'avons pas remarqué de modifications des mobilités électrophorétiques des fractions protéiques. Outre les fractions correspondant à l'hémoglobine, il n'y a pas d'apparition de nouvelles bandes.

Les mêmes expériences ont été réalisées avec des solutions de protéines plasmatiques de Truite et d'hémoglobine humaine, sans obtenir de résultats. Il semble donc qu'il n'y ait pas dans le plasma de la Truite arc-en-ciel de protéine comparable à l'haptoglobine du sérum humain.

VII - PROPOSITION DE CLASSIFICATION

En utilisant les résultats donnés par les trois techniques de fractionnement des protéines plasmatiques, nous pouvons élaborer une classification de celles-ci. Cette classification mettra en évidence la mobilité électrophorétique, le volume d'élution de la chromatographie et la solubilité différentielle dans le sulfate d'ammonium.

1°) Données de l'électrophorèse

Parmi les protéines séparées, nous avons considéré 13 fractions pour l'électrophorèse dans un gel à 9 % d'acrylamide. Ces fractions sont numérotées à partir de celles ayant les mobilités électrophorétiques les plus grandes.

Nous considérons la fraction 13 toujours à part car elle constitue un mélange des protéines, pouvant être scindées dans des gels de concentration moindre en acrylamide.

2°) Données de la chromatographie

La gel-filtration divise les protéines plasmatiques en trois groupes correspondant aux trois pics d'élution. Ces groupes seront appelés I, II et III. La séparation électrophorétique des protéines contenues dans chacun de ces groupes met en évidence :

- dans le groupe III, les fractions 1 à 5.
- dans le groupe II, les fractions 7 à 10.
- dans le groupe I, les fractions 11 à 13.

La même observation que précédemment s'applique à la fraction 13. Ceci permet d'établir la classification suivante :

1 III	2 III	3 III	4 III	5 III
7 II	8 II	9 II	10 II	
11 I	12 I			
13 I				

La bande centrale (fraction 6) n'étant pas retrouvée dans les éluats de la chromatographie sera appelée 6 0.

Ce mode de classification permet de montrer que l'élution des protéines se fait dans l'ordre des mobilités électrophorétiques décroissantes.

3°) Données de la précipitation fractionnée

Chaque fraction caractérisée comme précédemment sera définie complémentaiement par la concentration en sulfate d'ammonium exprimée en pourcentage de saturation pour laquelle elle est insoluble en quasi totalité. Cette concentration sera exprimée entre crochets. La bande centrale absente dans les précipités portera la notation 0 .

De cette manière, nous obtenons 7 groupes de fractions protéiques.

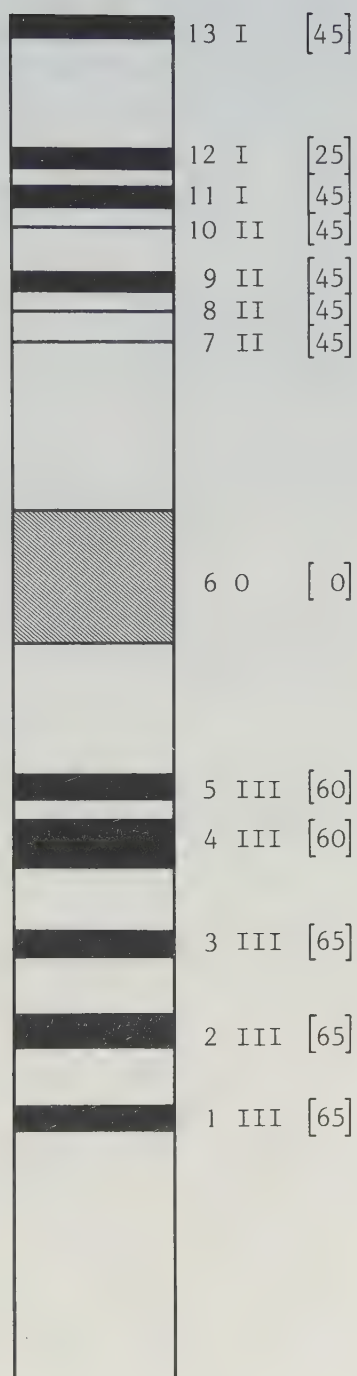
1 III	[65]	2 III	[65]	3 III	[65]
4 III	[60]	5 III	[60]		
6 0	[0]				
7 II	[45]	8 II	[45]	9 II	[45]
11 I	[45]				
12 I	[25]				
13 I	[45]				

Cette classification permet de grouper les fractions protéiques ayant des caractères physico-chimiques voisins. De plus, se trouvent ainsi individualisées des fractions particulières comme la bande centrale 6 0 [0], le fibrinogène 12 I [25] et la bande correspondant aux protéines ne migrant pas en gel à 9 %, 13 I [45] .

Nous pouvons remarquer aussi que les fractions assimilables à l'albumine de certains auteurs, 1 III [65], 2 III [65], 3 III [65] se retrouvent dans un même groupe.

Cette méthode de classification est fondée sur la mise en évidence simultanée d'un certain nombre de caractères physico-chimiques formels. Elle est bien évidemment incomplète car d'autres caractères pourraient être étudiés pour la préciser. Cependant, elle constitue un apport original qui paraît nettement préférable aux classification jusqu'alors

FIGURE n° 19



PROFIL ELECTROPHORETIC EN GEL A 9 % DE MONOMERE

DENOMINATION DES FRACTIONS PROTEIQUES SUIVANT LA CLASSIFICATION PROPOSEE

employées, dans lesquelles la reconnaissance des diverses fractions protéiques du plasma des Poissons était uniquement basée sur une assimilation aux protéines plasmatiques humaines. Nous pensons qu'elle peut servir de modèle à des études analytiques chez d'autres espèces.

VIII - RESUME

Nous avons donné sur la Figure n° 19, les numérotations de chacune des fractions. Nous indiquons ci-après pour chacune d'entre elles l'ensemble de leurs caractéristiques.

Fraction 1 III [65] : glycoprotéine, de mobilité électrophorétique élevée, présente dans le troisième pic de la chromatographie, précipitée par le sulfate d'ammonium à 65 % de saturation, thermolabile, non perchlorosoluble.

Fraction 2 III [65] : glycoprotéine, de mobilité électrophorétique élevée, présente dans le troisième pic de la chromatographie, précipitée par le sulfate d'ammonium à 65 % de saturation, thermostable, perchlorosoluble.

Fraction 3 III [65] : glycoprotéine, de mobilité électrophorétique élevée, présente dans le troisième pic d'élution de la chromatographie, précipitée par le sulfate d'ammonium à 65 % de saturation, thermostable, perchlorosoluble.

Fraction 4 III [60] : glycoprotéine, de mobilité électrophorétique moyenne, présente dans le troisième pic d'élution de la chromatographie, précipitée par le sulfate d'ammonium à 60 % de saturation, thermolabile.

Rôle physiologique : transferrine.

Fraction 5 III [60] : glycoprotéine, de mobilité électrophorétique moyenne, présente dans le troisième pic d'élution de la chromatographie, précipitée par le sulfate d'ammonium à 60 % de saturation, thermostable, perchlorosoluble.

Fraction 6 0 [0] : glycoprotéine de mobilité électrophorétique moyenne, absente dans l'éluat de chromatographie, dénaturée par le sulfate d'ammonium, thermo-labile.

Fraction 7 II [45] : protéine de mobilité électrophorétique faible, présente dans le deuxième pic d'élution de la chromatographie, précipitée par le sulfate d'ammonium à 45 % de saturation, thermolabile.

Fraction 8 II [45] : protéine de mobilité électrophorétique faible, présente dans le deuxième pic d'élution de la chromatographie, précipitée par le sulfate d'ammonium à 45 % de saturation, thermolabile.

Fraction 9 II [45] : protéine de mobilité électrophorétique faible, présente dans le deuxième pic d'élution de la chromatographie, précipitée par le sulfate d'ammonium à 45 % de saturation, thermostable.

Fraction 10 II [45] : protéine de mobilité électrophorétique faible présente dans le deuxième pic d'élution de la chromatographie, précipitée par le sulfate d'ammonium à 45 % de saturation, thermolabile.

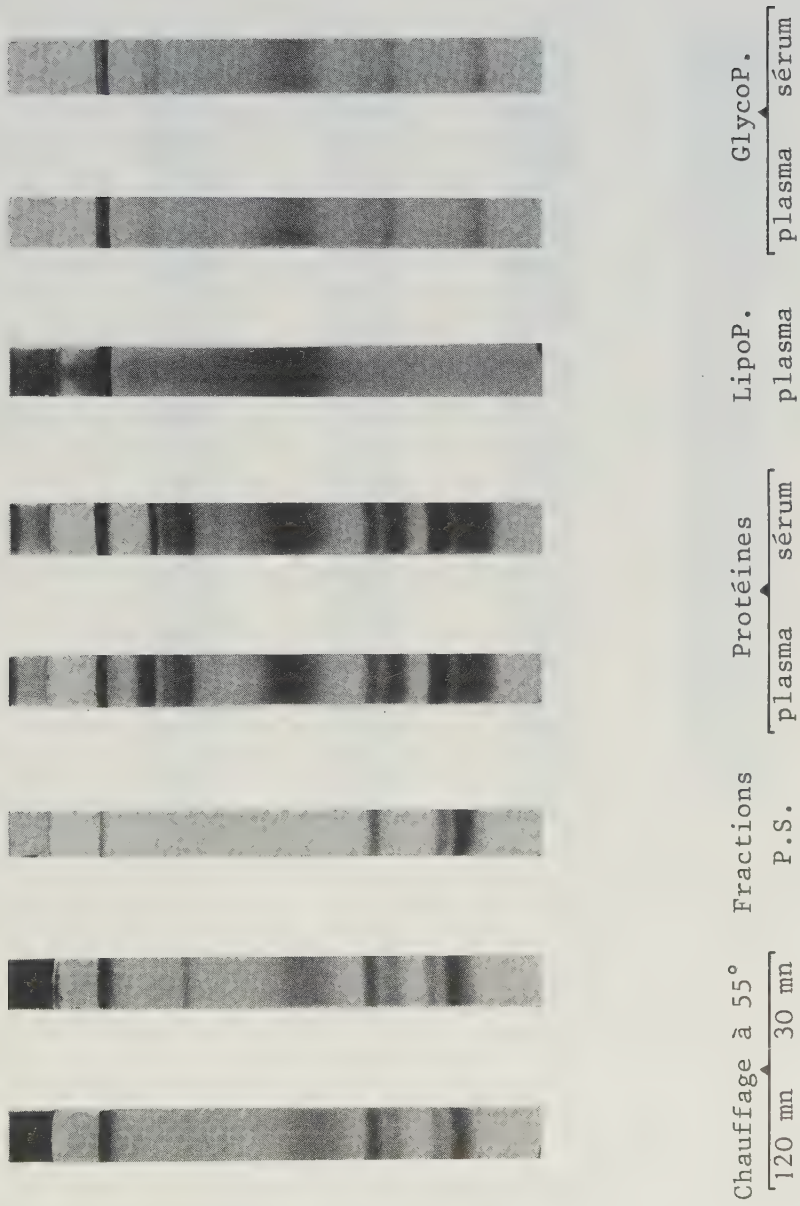
Fraction 11 I [45] : glycoprotéine de mobilité électrophorétique faible, présente dans le premier pic d'élution de la chromatographie, précipitée par le sulfate d'ammonium à 45 % de saturation, thermolabile.

Fraction 12 I [25] : protéine de mobilité électrophorétique faible, présente dans le premier pic d'élution de la chromatographie, précipitée par le sulfate d'ammonium à 25 % de saturation, thermolabile.

Rôle physiologique : fibrinogène.

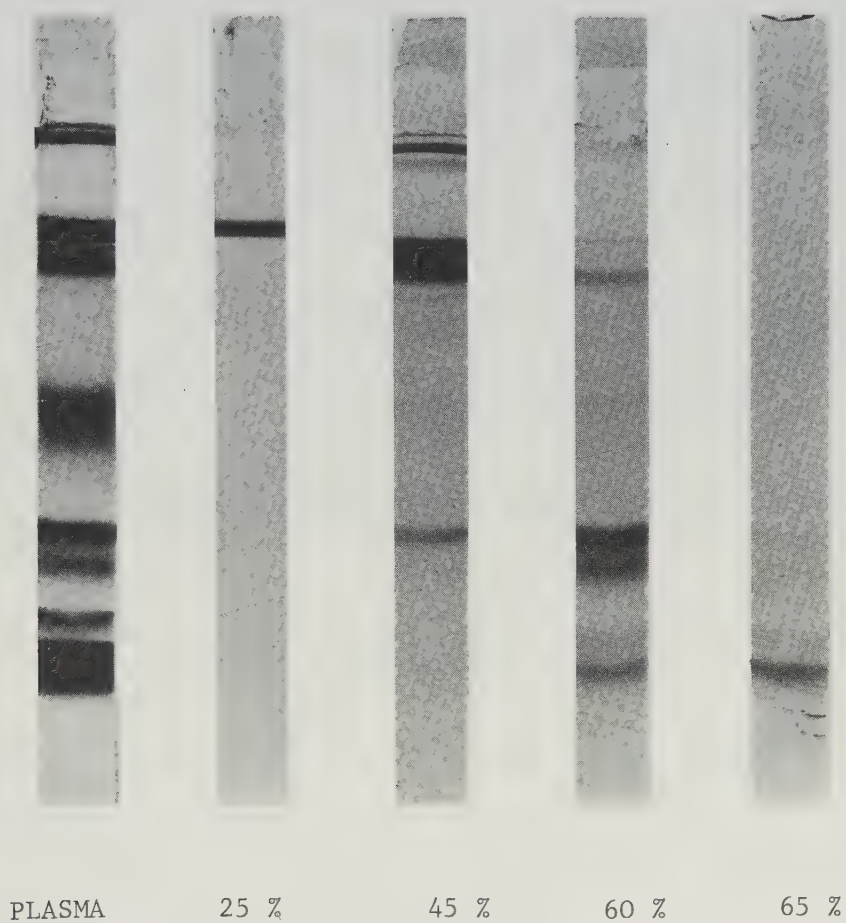
Fraction 13 I [45] : complexe glycolipoprotéique, de mobilité électrophorétique nulle, présente dans le premier pic d'élution de la chromatographie, précipitée par le sulfate d'ammonium à 45 % de saturation, résistance à la chaleur non déterminée.

Groupe fractionné par électrophorèse en gel à 5,5 % d'acrylamide donnant deux fractions de mobilité faible (une de nature lipoprotéique, une de nature glycolipoprotéique) et une fraction de mobilité nulle, de nature glycolipoprotéique mais dont la copule protéique est peu importante.



Photographie de profils électrophorétiques obtenus en gel de polyacrylamide à 9 % de monomère

Etude d'ensemble réalisée sur le plasma et le sérum d'un même animal.



Précipitations fractionnées par le sulfate d'ammonium

(les concentrations sont exprimées en pourcentage de saturation)

CONCLUSIONS

L'étude analytique des composés protéiques du plasma de la Truite Arc-en-Ciel d'élevage (*Salmo gairdneri Richardson*) immature a été réalisée à l'aide de trois techniques principales :

- électrophorèse en gel de polyacrylamide (disc-electrophoresis),
- chromatographie de gel-filtration,
- précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium.

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide à 9 % a montré l'existence de 16 fractions protéiques. Parmi celles-ci, la dernière fraction, de mobilité nulle, a pu être scindée en plusieurs composants. D'autre part, les fractions ayant la plus forte mobilité peuvent se présenter sous trois aspects différents.

Nous n'avons pas constaté la présence d'un composé particulier lié au sexe de l'animal, ni l'existence de variations saisonnières notables.

Des études particulières portant sur les 13 fractions principales ont permis d'établir l'existence de :

- 6 fractions glycoprotéiques,
- 2 fractions lipoprotéiques, dont la composition globale en lipides a été étudiée,
- 3 fractions partiellement perchlorosolubles.

La résistance à la chaleur et l'influence du mode de conservation du plasma ont été également envisagées.

Les résultats obtenus avec les diverses techniques nous ont permis d'établir une classification d'ensemble des protéines plasmatiques.

Nous avons, par ailleurs, cherché à localiser des composés ayant un rôle métabolique défini :

- Le fibrinogène a été facilement identifié. Il correspond, en effet, à la fraction qui, sur les diagrammes électrophorétiques, est présente dans le plasma et absente dans le sérum. Il précipite isolément dans le sulfate d'ammonium à 25 % de saturation. La composition en acides aminés de cette protéine a pu être établie ; elle est assez comparable à celle du fibrinogène humain.

- La transferrine a été étudiée à l'aide du fer radio-actif. Nous avons pu localiser ce composé par comptage de radio-activité sur des fragments de gels et sur des fractions obtenues par relargage. La transferrine se présente en une bande unique à l'électrophorèse ; c'est une glycoprotéine, précipitant dans le sulfate d'ammonium à 60 % de saturation.
- L'étude d'une protéine assimilable à la céruloplasmine a également été envisagée. La quasi-totalité du cuivre plasmatique est retrouvée dans les fractions insolubles dans le sulfate d'ammonium à demi-saturation. D'autre part, une bande d'activité oxydasique a été décelée à l'électrophorèse dans une zone correspondante. Cependant il n'a pas été possible de localiser cette protéine de façon précise.
- Il faut signaler l'absence dans le plasma de Truite d'une fraction holoprotéique prédominante comparable à la sérum-albumine humaine.

Enfin, nous avons noté la présence d'un complexe glyco-lipoprotéique dont les caractères physico-chimiques sont très particuliers. Nous avons retrouvé des complexes semblables dans le plasma d'autres espèces de Poissons. Il semble s'agir d'un composé caractéristique du plasma de ces animaux.

Cette étude d'ensemble nous a permis de définir dans le plasma de la Truite Arc-en-Ciel, treize fractions protéiques principales dont nous avons étudié certains caractères physico-chimiques. Le fibrinogène et la transferrine ont été localisés de façon précise.

Le Président de la Thèse

Vu, le Directeur de l'U.E.R.
des Sciences Pharmaceutiques

Jean GRAS

Maurice CARRAZ

Vu et permis d'imprimer
LYON, le 10 novembre 1972

Le Président de l'Université
Claude-Bernard,

J. BOLDIN

BIBLIOGRAPHIE

- 1 - ANDREWS (P.)
Estimation of the molecular weights of proteins by Sephadex gel filtration.
Biochem. J., 91, 222-233, (1964).
- 2 - ANDREWS (P.)
The gel-filtration behaviour of proteins related to their molecular weights over a wide range.
Biochem. J., 96, 595-606, (1965).
- 3 - AUGUSTINSSON (K.B.)
Electrophoresis studies on blood plasma esterases.
II - Avian, Reptilian, Amphibian and Piscine Plasmata.
Acta Chemica Scandinavia, 13, 1081-1096, (1959).
- 4 - BADAWI (H.K.)
Electrophoretic studies of serum proteins of four Tilapia species.
Mar. Biol., 8, 96-98, (1971).
- 5 - BALAKHNIN (I.A.) and SOLOMATINA (V.D.)
Transferrines types and their connection with some exterior indexes in carp.
Gidrobiol. Zh., 6, 56-61, (1970).
- 6 - BARNOUD (R.), FREY (J.) et PERES (G.)
Diagramme électrophorétique du sérum de Tanche (Tinca tinca)
C.R. Acad. Sci., 256, 5622-5624, (1963).
- 7 - BARNOUD (R.) et PERES (G.)
Recherches sur la protidémie de la Tanche soumise à l'asphyxie par confinement.
J. Physiol., 55, 193-194, (1963).
- 8 - BECKER (E.L.) and BIRD (R.)
Physiology of marine Teleosts.
Phys. Zool., 31, 228-231, (1958).
- 9 - BERENBLUM (I.) and CHAIN (E.)
An improved method for the colorimetric determination of phosphate.
Biochem. J., 32, 295-298, (1938).

- 10 - BISERTE (C.), SEZILLE (G.), BERTRAND (M.) et JAILLARD (J.)
Exploration lipidique au cours du diabète.
Ann. Biol. Clin., 22, 861-897, (1964).
- 11 - BOOKE (H.E.)
Blood serum protein and calcium levels in yearling brook-trout.
Progr. Fish. Cult., 26, 107, (1964).
- 12 - BOUCHER-FIRLY (S.)
Sur la teneur en protéines du sérum d'anguille et de congre et ses variations au cours des changements de salinité.
C.R. Soc. Biol., 115, 952, (1934).
- 13 - BOUCK (G.R.) and BALL (R.C.)
Influence of a diurnal oxygen pulse on fish serum proteins.
Trans. Am. Fish. Soc., 94, 363-370, (1965).
- 14 - BOUCK (G.R.) and BALL (R.C.)
Distribution of low mobility proteins in the blood of fishes.
J. Fish. Res. Bd. Canada, 24, 695-697, (1967).
- 15 - BOUGIS (P.)
Recherches biométriques sur les rougets (Mullus)
Arch. Zool. Exp. Gen., 84, 57-174, (1952).
- 16 - BUTLER (D.G.)
Effect of hypophysectomy on osmoregulation in the European eel (Anguilla anguilla)
Comp. Biochem. Physiol., 18, 773-781, (1966).
- 17 - CARBERY (J.T.)
Correlation between total serum protein and albumin/globulin ratio in malnourished brown trout.
Veterinary Record, 175, 8 aout 1970.
- 18 - CARNEGIE (P.R.)
A peptide-mapping technique for the estimation of molecular size.
Nature, 206, 1128-1130, (1965).
- 19 - CHAN (D.K.O.), CHESTER-JONES (I.), HENDERSON (I.W.) and RANKIN (J.C.)
Studies on the experimental alteration of water and electrolyte composition of the eel (Anguilla anguilla)
J. Endocrinol., 37, 297-317, (1967).
- 20 - COHN (E.J.)
Dans précis de Chimie Biologique, tome II, page 220
COURTOIS (J.E.) et PERLES (R.)
MASSON et Cie, éditeurs, (1965).

- 21 - CORDIER (D.) et BARNOUD (R.)
Effet de l'agression osmotique sur la protéinémie de la rascasse.
C.R. Soc. Biol., 153, 1368-1370, (1959).
- 22 - CORDIER (D.) et BARNOUD (R.)
Effet de l'agression osmotique sur la protéinémie de l'Anguille de mer.
C.R. Soc. Biol., 153, 1802-1805, (1959).
- 23 - CORDIER (D.), BARNOUD (R.) et BRANDON (A.M.)
Etude sur les protéines du sang de *Scyllium canicula*.
C.R. Soc. Biol., 151, 1912-1915, (1957).
- 24 - COURTOIS (J.E.) et PERLES (R.)
Précis de Chimie biologique. Tome II, p. 212, (1965).
MASSON et Cie, Editeurs.
- 25 - CREAC'H (Y.) et SERFATY (A.)
Les amino-acides libres du sang de la Carpe commune.
C.R. Soc. Biol., 158, 1152-1156, (1964).
- 26 - DAS (B.C.)
Age-related trends in the blood chemistry and haematology of the Indian carp, (*Cattla cattla*)
Gerontologia, 10, 47-64, 1965.
- 27 - DAVIS (B.J.)
Disc electrophoresis.
II - Method and application to human serum proteins.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 104-127, (1964).
- 28 - DEAN (J.M.)
The metabolism of tissues of thermally acclimated trout (*Salmo Gairdnerii*)
Comp. Biochem. Physiol., 29, 185-196, (1969).
- 29 - DELSAL (J.L.)
Nouveau procédé d'extraction des lipides du sérum par le méthylal.
Applications aux micro-dosages du cholestérol total, des phosphoamino-lipides et des protéides.
Bull. Soc. Chim. Biol. (PARIS), 26, 99-105, (1944).
- 30 - DEUTSCH (M.F.) and Mc SHAN (W.H.)
Biological studies of blood plasma proteins.
XII - Electrophoretic studies of the blood serum proteins of some lower animals.
J. Biol. Chem., 180, 219-234, (1949).

- 31 - DE VRIES (A.L.)
Glycoproteins as biological anti-freeze agents in Antarctic fishes.
Science, 172, 3988, (1971).
- 32 - DE VRIES (A.L.), VANDENHEEDE (J.) and FEENEY (R.E.)
Primary structure of freezing-point depressing glycoproteins.
J. Biol. Chem., 246, 305-308, (1971).
- 33 - DOOLITTLE (R.F.) and SURGENOR (D.M.)
Blood coagulation in fish.
Amer. J. Physiol., 203, 964-970, (1962).
- 34 - DRILHON (A.)
Etude de quelques diagrammes électrophorétiques de plasma de Poissons.
C.R. Acad. Sci., 237, 1779-1781, (1953).
- 35 - DRILHON (A.)
Etude des protéines sériques des poissons.
Quelques aspects particuliers.
Ann. Biol., 7, 652-682, (1968).
- 36 - DRILHON (A.) et FINE (J.M.)
Dimorphisme sexuel dans les protéines sériques de Salmo salar.
Etude électrophorétique.
C.R. Soc. Biol., 157, 1897, (1963).
- 37 - DUFOUR (D.) et BARRETTE (D.)
Polymorphisme des lipoprotéines et des glycoprotéines sériques
chez la truite.
Experientia, 23, 955, (1967).
- 38 - EDELMAN (G.M.) and POULIK (R.)
Studies on structural units of the gamma-globulins.
J. Exp. Med., 113, 861-865, (1961).
- 39 - EINSZPORN-ORECKA (T.)
Seasonal variations in the protein composition of blood serum of
tenches (Tinca tinca)
Pol. Arch. Hydrobiol., 17, 445-461, (1970).
- 40 - ENGLE (R.L.) and WOODS (K.R.)
Phylogenesis of plasma proteins and plasma cells.
Observations on the occurrence of plasma cells in marine Fishes.
Biol. Bull. Woods-Hole, 113, 363-365, (1957).
- 41 - ENGLE (R.L.), WOODS (K.R.), PAULSEN (E.C.) and PERTH (J.H.)
Plasma cells and serum proteins in marine Fishes.
Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 98, 905-909, (1958).

- 42 - FALKNER (N.W.)
The binding of ^{125}I - 3-5-3' triodo-L-thyronine and ^{125}I -L-Thyroxine to the plasma proteins of the brook-trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill) Ph. D. Thesis, University of Manitoba, (1970).
- 43 - FELGENHAUER (K.)
Quantification and specific detection method after disc electrophoresis of serum proteins.
Clin. Chim. Acta., 27, 305-312, (1970).
- 44 - FIELD (J.B.), ELVEHSEM (C.A.) and JUDAY (C.)
A study of the blood constituents of carp and trout.
J. Biol. Chem., 148, 261-269, (1943).
- 45 - FINE (J.M.) et DRILHON (A.)
Etude électrophorétique et immunologique des protéines sériques de quelques espèces de Salmonidés.
C.R. Soc. Biol., 158, 1307-1310, (1964).
- 46 - FINE (J.M.), BOFFA (G.A.) and DRILHON (A.)
Comparative biochemistry of transferrins.
Actes Congr. Nat. Transf. Sang., 2, 479-482, (1968).
- 47 - FLODIN (P.)
Methodological aspects on gel filtration reference to desalting operations.
J. Chromatog., 5, 103-115, (1961).
- 48 - FONTAINE (M.)
Les poissons migrateurs.
Revue Atomes, 24, 715-720, (1969).
- 49 - FREEMAN (H.C.) and IDLER (D.R.)
Binding affinities of blood proteins for sex hormones and corticosteroids in fishes.
Steroids, 17, 233-250, (1971).
- 50 - GALLETTI (F.)
A simplified procedure for the colorimetric determination of serum esterified fatty acids.
Clin. Chim. Acta, 6, 749, (1961).
- 51 - GARSIDE (E.T.) and TAIT (J.S.)
Preferred temperature of rainbow trout, (*Salmo gairdnerii* Richardson) and its usual relationship to acclimation temperature.
Canad. J. Zool., 36, 563-567, (1958).

- 52 - GELOTTE (B.), FLODIN (P.) et KILLANDER (J.)
Fractionation of human plasma proteins by gel-filtration and zone electrophoresis or ion-exchange chromatography.
Arch. Biochem., Suppl. 1, 319-326, (1962).
- 53 - GOT (R.)
Etude sur les glycoprotéines du sérum de congre (*Conger vulgaris*) et de roussette (*Scyllium stellare*)
C.R. Soc. Biol., 159, 2323-2325, (1965).
- 54 - GOT (R.), FONT (J.) et GOUSSAULT (Y.)
Etude sur une transferrine de Sélacien, la grande Roussette, (*Scyllium stellare*)
Comp. Biochem. Physiol., 23, 317-327, (1967).
- 55 - GOVOREVA (M.F.)
Oxydase activity of serum ceruloplasmin of carp.
In Chem. Abstrs., 68, (1968), 111691.
- 56 - GRAS (J.)
Communication personnelle.
- 57 - GRAS (J.), SAIFI (Q.) et GUDEFIN (Y.)
Etude immuno-électrophorétique des protéines sériques et des protéines solubles de tissus musculaires de la truite arc-en-ciel d'élevage (*Salmo gairdnerii* Richardson).
C.R. Soc. Biol., 164, 1535-1538, (1970).
- 58 - GREENE (C.W.)
Physiological studies of the chinook Salmon.
II - A study of the blood and serous liquides by the freezing-point method.
Bull. Bur. Fish. Wash., 24, 445-456, (1904).
- 59 - GUNTER (G.), SULYA (L.L.) and BOX (B.E.)
Some evolutionary patterns in fishes blood.
In : The chemical biology of fishes.
Academic. Press., p. 137, LONDON, NEW-YORK, (1970).
- 60 - HALL (F.G.)
Blood concentration in marine fishes.
J. Biol. Chem., 76, 623-631, (1928).
- 61 - HERSHBERGER (W.K.)
Some physicochemical properties of transferrins in brook trout.
Trans. Am. Fish. Soc., 1, 207-218, (1970).

- 62 - HODGINS (H.O.), WEISER (R.S.) and RIGWAY (G.J.)
The nature of antibodies and the immune response in rainbow trout
(*Salmo gairdnerii*)
J. Immunol., 99, 534, (1967).
- 63 - HOUSTON (A.H.) and MADDEN (J.A.)
Environmental temperature and plasma electrolyte regulation in the
carp *Cyprinus carpio*.
Nature (LONDON), 217, 969-970, (1968).
- 64 - HUANG (C.T.) and HICKMAN (C.P.)
Binding of inorganic iodine to the plasma proteins of teleost fishes.
J. Fish. Res. Bd. Canada, 25, 1651-1666, (1968).
- 65 - JARA (Z.)
Studies on the mechanism of thrombinogenesis in Carp (*Cyprinus carpio*)
Zoologica Poloniae, 11, 101-129, (1961).
- 66 - JEROME (H.) et GIRAULT (M.)
Dosage de la céruloplasmine. Normalisation des résultats.
Ann. Biol. Clin., 27, 371-374, (1969).
- 67 - JURCA (V.)
Biochemistry of the fed trout. (*Salmo gairdnerii*).
II - Proteins in blood serum as a function of their presence in the
diet and effect of molybdenum on serum proteins.
"Al. I. Cuza." Iasi, Sec. Ic, 13, 213-221, (1967).
- 68 - JUUL (P.)
Human plasma cholinesterase iso-enzymes.
Clin. Chim. Acta., 19, 205-213, (1968).
- 69 - KIRSIPUU (A.)
Seasonal cycle of changes in the blood serum protein fractions in
bream.
Izvest. Akad. Nauk. Eston. SSSR. Biol., 20, 133-140, (1971).
- 70 - KOMATSU (S.K.), MILLER (H.T.), DE VRIES (A.), OSUGA (D.T.) and
FEENEY (R.)
Blood plasma proteins of cold adapted antarctic fishes.
Comp. Biochem. Physiol., 32, 519-527, (1970).
- 71 - KOROLEVA (N.V.)
Changes in protein content in blood serum of rainbow-trout depending
on age and nutrition.
Dokl. Akad. Nauk. SSSR., 149, 1185-1186, (1963).

- 72 - KOROLEVA (N.V.)
Protein content in blood plasma of rainbow-trout (*Salmo gairdnerii*)
Izu. Gos. Nauchn. Issled. Inst. ozvern. i. Rechn. Rybn. Khoz.,
58, 109-116, (1964).
- 73 - LAURENT (T.C.) and KILLANDER (J.)
A theory of gel-filtration and its experimental verification.
J. Chromatog., 14, 317-330, (1964).
- 74 - LAUTER (C.J.), BROWN (E.A.B.) and TRAMS (E.G.)
Composition of plasma lipoproteins of the spiny dogfish *Squalus acanthia*.
Comp. Biochem. Physiol., 24, 243-247 (1968).
- 75 - LECAL (J.)
Influence de la salinité sur les protéines sériques de *Blennius pavo*.
C.R. Soc. Biol., 152, 1492-1494, (1958).
- 76 - LE CREN (E.D.)
Observations on the growth of perch (*Perca fluviatilis*) over twenty-two years with special reference to the effects of temperature and change in population density.
J. Anim. Ecol., 27, 287-334, (1958).
- 77 - LELOUP (J.)
Répartition zoologique de la protéine plasmatique de liaison des iodures chez les poissons.
J. Physiol. (PARIS), 56, 593-594, (1964).
- 78 - LELOUP (J.)
Caractéristiques de la liaison des iodures dans le plasma de certains téléostéens.
J. Physiol. (PARIS), 56, 594-595, (1964).
- 79 - LOGEMANN (H.)
In Methoden der Org. Chemie, (Houben-Weyl).
Thieme, STUTTGART, vol. XIV, Part. 1, p. 291, (1961).
- 80 - LOVE (R.M.)
The chemical biology of fishes.
Academic Press, 1970.
- 81 - LUK'JANENKO (V.I.) et POPOV (A.V.)
Hétérogénéité à l'électrophorèse des protéines sériques chez les poissons cartilagineux, osseux et cartilagineux-osseux.
Zh. evol. Biokhim. Fisiol. SSSR., 7, 35-40, (1971).

- 82 - Mc CARTNEY (T.H.)
Monthly variations of the serum total cholesterol and serum total lipid-phosphorus of mature brown-trout.
Fish. Res. Bull. N.Y., 30, 42-45, (1967).
- 83 - Mc FARLAND (W.N.) and KLONTZ (G.W.)
Anesthesia in fishes.
Fed. Proc., 28, 1535-1540, (1969).
- 84 - Mc KENZIE (J.A.) and PAIM (V.)
Variations in the plasma proteins of atlantic Salmon, *Salmo salar*.
Can. J. Zool., 47, 759-761, (1969).
- 85 - Mc KIM (J.M.), CHRISTENSEN (G.M.) and HUNT (E.P.)
Changes in the blood of brook trout (*Salvenilus fontinalis*) after short term and long term exposure to copper.
J. Fish. Res. Bd. Canada, 27, 1883-1889, (1970).
- 86 - MAIRS (D.F.) and SINDERMAN (C.J.)
Intraspecies variability in electrophoretic patterns of fish serum.
Anat. Rec., 137, 377-378, (1960).
- 87 - MARCHALONIS (J.J.)
Isolation and partial characterization of immunoglobulins of goldfish (*Carassius auratus*) and Carp (*Cyprinus carpio*)
Immunology, 20, 161-173, (1971).
- 88 - MARCHALONIS (I.) and EDELMAN (G.M.)
Multichain structure of the immunoglobulins in the smooth fishes (*Mustelus canis*).
J. Exp. Med., 122, 601-607, (1965).
- 89 - MATTY (A.J.)
Thyroid protein-bound iodine of a teleost fish (*Scarus guacamaia*)
J. Endocrinol., 19, 353-358, (1959).
- 90 - MAURER (H.R.)
Disc Electrophoresis and related techniques of polyacrylamide gel electrophoresis.
Walter de Gruyter Ed. BERLIN-NEW-YORK, 1971.
- 91 - MEISNER (H.M.) and HICKMAN Jr (C.P.)
Effect of temperature and photoperiod on the serum proteins of the rainbow trout, *Salmo gairdnerii*.
Canad. J. Zool., 40, 127-130, (1962).

- 92 - MOISEEV (P.)
Fluctuations in the commercial fish populations of the north-western Pacific in relation to environmental and other factors.
Intern. Tech. Conf. of living Resources of the Sea, 266-289.
United Nations, ROME, (1955).
- 93 - MONNET (L.), MONNET (M.) et CORNET (A.)
Dosage du cholestérol du sérum sanguin.
Ann. Biol. Clin., 26, 915-924, (1968).
- 94 - MOORE (S.) and STEIN (W.H.)
Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino-acids.
J. Biol. Chem., 176, 367-388, (1948).
- 95 - MOORE (S.) and STEIN (W.H.)
Chromatography of amino-acids on sulfonated polystyrene resins.
J. Biol. Chem., 192, 663-681, (1951).
- 96 - NEALE (J.H.) and GRAY (I.)
Protein synthesis and retention of a conditioned response in rainbow trout as affected by temperature reduction.
Brain Res., 26, 159-168, (1971).
- 97 - NIKOLSKY (G.V.)
The Ecology of Fishes.
Academic Press., LONDON, (1963).
- 98 - NODA (H.)
Studies on various phosphatases of the fishes.
III - Changes in the activity of phosphatases during development of rainbow trout, *Salmo irideus*.
J. Fac. Fish., Pref. Univ. Mie-Tsu, 7, 57-64, (1967).
- 99 - NODA (H.)
Studies on various phosphatases of the fishes.
IV - Effect of growth upon phosphatases activities of rainbow trout, *Salmo irideus*.
J. Fac. Fish. Pref. Univ. Mie-Tsu, 7, 65-71, (1967).
- 100 - NODA (H.)
Studies on various phosphatases of the fishes.
V - Variation in four phosphatases activities during fasting of rainbow trout, *Salmo irideus*.
J. Fac. Fish. Pref. Univ. Mie-Tsu, 7, 73-80, (1967).

- 101 - ODENSE (P.H.), ALLEN (T.M.) and LEUNG (T.C.)
Multiple forms of lactate deshydrogenase and aspartate amino-transfere-
rase in herring (*Clupea harengus harengus* L.).
Can. J. Biochem. Physiol., 44, 1319-1326, (1966).
- 102 - ORNSTEIN (L.)
Disc Electrophoresis : background and theory.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 321-349, (1964).
- 103 - OSTROUMOVA (I.N.)
Protein composition of serum in fish of the Salmon family.
Obmen. Veshchestv. Biokhim. Ryb, Akad. Nomk. SSSR. Min. Ryb. Khoz.
SSSR. Ikhtiol. Korm., 283-290, (1967).
- 104 - OTT (H.)
Electrophoresis in acrylamide gel.
Protides, Biol. Fluids, Proc. Colloq., 10, 305-308, (1963).
- 105 - PERRIER (C.)
Aspects biochimiques de l'action de l'adrénaline chez la truite
arc-en-ciel d'élevage. (*Salmo gairdnerii* Richardson)
Thèse Doctorat Pharmacie, LYON, 1971.
- 106 - PHILLIPS Jr (A.M.) and BROCKWAY (D.R.)
The nutrition of trout.
IV - Vitamin requirements.
Prog. Fish. Cult., 19, 119-123, (1957).
- 107 - PHILLIPS Jr (A.M.), LIVINGSTONE (D.L.) and DUMAS (R.F.)
Effect of starvation and feeding on the chemical composition of
brook trout.
Progr. Fish. Cult., 22, 147-154, (1960).
- 108 - PHILLIPS Jr (A.M.), LIVINGSTONE (D.L.), POSTON (H.A.) and BOOKE (H.A.)
The effect of diet mixture and caloric source on growth, mortality,
conversion and chemical composition of brook trout.
Progr. Fish. Cult., 25, 8-14, (1963).
- 109 - POST (G.)
Serum proteins and antibody production in rainbow trout (*Salmo gaird-
nerii*).
J. Fish. Res. Bd. Canada, 23, 1957-1963, (1966).
- 110 - PRAT (J.P.), LAMY (J.N.) et WEILL (J.D.)
Coloration des lipoprotéines après électrophorèse en gel de polyacry-
lamide.
Bull. Soc. Chim. Biol., 51, 1367, (1969).

- 111 - RAO (G.M.M.)
Effect of activity, salinity and temperature on plasma concentrations of rainbow trout.
Canad. J. Zool., 47, 131-134, (1969).
- 112 - RAYMOND (J.)
Acrylamide gel electrophoresis.
Ann. N.Y. Acad. Sci., 121, 350-365, (1964).
- 113 - SAIFI (Q.)
Etude qualitative et quantitative des protéines sériques et musculaires chez la truite arc-en-ciel d'élevage. (*Salmo gairdnerii* Richardson).
Thèse Doc. Univ. Pharm., LYON, 1969.
- 114 - SALIBIAN (A.)
Electroforesis en gel de poliacrilamida de las seroproteinas de algunos especes teleostos.
Rev. Soc. Argent. Biol., 41, 121-127, (1965).
- 115 - SINDERMANN (C.J.) and MAIRS (D.F.)
Blood properties of prespawning and postspawning anadromous alewives (*Alosa pseudo harengus*).
Fish. Bull., 183, 145-151, (1961).
- 116 - SORVACHEV (K.F.)
Changes in proteins of carp blood serum during hibernation.
Biokhimiya, 22, 872-878, (1957).
- 117 - SORVACHEV (K.F.)
Biokhimiya, 22, 5, (1957).
- 118 - SREBNICKAJA (L.K.)
Etude électrophorétique des protéines sériques de quelques espèces de poissons de la famille des carpes.
Vzlock. Biol. Zh., 12, 8-10, (1968).
- 119 - THORUN (W.)
Molecular sieving effect in polyacrylamide gel electrophoresis as a function of molecular size, gel concentration and gel crosslinkage and its use in the determination of molecular weights.
Z. Klin. Chem. U. Klin. Biochem., 9, 3-12, (1971).
- 120 - THURSTON (R.V.)
Electrophoretic patterns of blood serum proteins from rainbow trout *Salmo gairdnerii*.
J. Fish. Res. Bd. Canada, 24, 2169-2188, (1967).

- 121 - TOMBS (M.P.)
The interpretation of gel electrophoresis.
Anal. Biochem., 13, 121-132, (1965).
- 122 - TRISTAM (G.R.)
The Proteins, vol. I A, p. 215, (1953).
(H. NEURATH and K. BAILEY, eds.), Academic Press, NEW-YORK.
- 123 - UMMINGER (B.L.)
Patterns of osmoregulation in freshwater fishes at temperatures near freezing.
Physiol. Zool., 44, 20-27, (1971).
- 124 - WEICHSELBAUM (T.A.)
Amer. J. Clin. Path., Techn. Suppl. 10, 40, (1946).
- 125 - WHITAKER (J.R.)
Determination of molecular weights of proteins by gel-filtration on Sephadex.
Anal. Chem., 35, 1950-1953, (1963).
- 126 - WILSON (S.) and DIXON (G.H.)
A comparison of cod and bovine insulins.
Nature, 191, 876-879, (1961).
- 127 - WRIGHT Jr (J.E.) and ATHERTON (L.M.)
Polymorphisms for LDH and Transferrin Loci in Brook Trout Populations.
Trans. Am. Fish. Soc., 99, 179-192, (1970).

TABLE DES FIGURES

	<u>Pages</u>
1 - Chromatographie des lipides plasmatiques totaux	51
2 - Profil électrophorétique en gel à 9 % de monomère	54
3 - Différents aspects des fractions de grande mobilité	56
4 - Tracé densitométrique	58
5 - Glycoprotéines et lipoprotéines	60
6 - Profils électrophorétiques des protéines plasmatiques d'autres espèces de Poissons	62
7 - Diagramme d'élution de la chromatographie sur Séphadex G 200	65
8 - Fractions protéiques des 3 pics de la chromatographie	67
9 - Précipitation fractionnée.....	70
10 - Conservation du plasma	72
11 - Résistance à la chaleur	74
12 - Fractions perchlorosolubles	76
13 - Etude électrophorétique du fibrinogène	78
14 - Teneur en cuivre de l'éluant de chromatographie	82
15 - Localisation de la transferrine après électrophorèse	85
16 - Tracé densitométrique et pourcentage de radio-activité ...	87
17 - " " "	88
18 - " " "	89
19 - Schéma récapitulatif	106

TABLE DES MATIERES

	<u>Pages</u>
<u>INTRODUCTION</u>	1
<u>PLAN</u>	2
<u>CHAPITRE I</u> : LES PROTEINES PLASMATIQUES CHEZ LES POISSONS	6
<u>CHAPITRE II</u> : MATERIEL ET TECHNIQUES	23
<u>CHAPITRE III</u> : RESULTATS ET COMMENTAIRES	50
<u>CHAPITRE IV</u> : DISCUSSION ET INTERPRETATION	91
<u>CONCLUSIONS</u>	111
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	113

